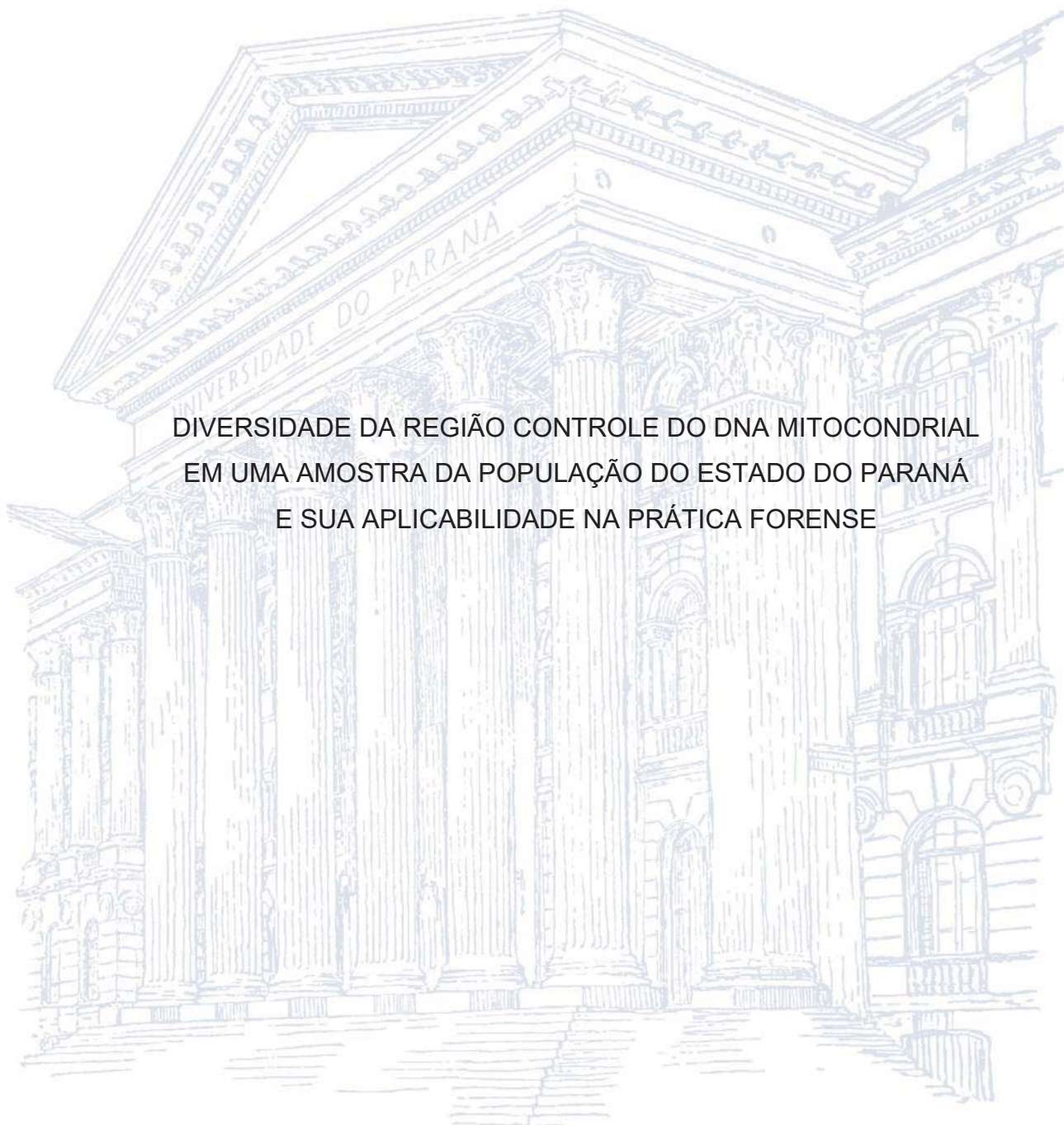


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANE MOREIRA POLETTO

DIVERSIDADE DA REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL
EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ
E SUA APLICABILIDADE NA PRÁTICA FORENSE



CURITIBA

2018

MARIANE MOREIRA POLETTO

DIVERSIDADE DA REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL
EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ
E SUA APLICABILIDADE NA PRÁTICA FORENSE

Dissertação apresentada como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em Genética, Setor
de Ciências Biológicas, Departamento de Genética da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^a. Dra. Karin Braun Prado

Co-Orientadores: Prof^a. Dra. Maria da Graça Bicalho
Prof. Dr. Marcelo Malaghini

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Poletto, Mariane Moreira

Diversidade da região controle do DNA mitocondrial em uma amostra da população do estado do Paraná e sua aplicabilidade na prática forense. / Mariane Moreira Poletto. – Curitiba, 2018.

59 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Karin Braun Prado

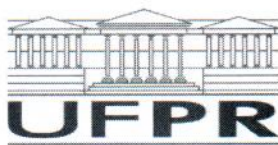
Co-orientadora: Maria da Graça Bicalho

Co-orientador: Marcelo Malaghini

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética forense. 2. DNA mitocondrial. I. Título. II. Prado, Karin Braun. III. Bicalho, Maria da Graça. IV. Malaghini, Marcelo. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 614.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIANE MOREIRA POLETTTO** intitulada: **Diversidade da região controle do DNA mitocondrial em uma amostra da população do estado do Paraná e sua aplicabilidade na prática forense.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Março de 2018.

KARIN BRAUN-PRADO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

LEONARDO ARDUINO MARANO

Avaliador Externo (USP)

MARCIA HOLSBACH BELTRAME

Avaliador Externo (null)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e aos meus co-orientadores, Karin Braun Prado, Maria da Graça Bicalho e Marcelo Malaghini por todo apoio, incentivo e confiança.

Às professoras Daniele Malheiros e Patricia Savio, membros da banca de acompanhamento, que durante o desenvolvimento deste projeto deram importantes sugestões para a melhoria do mesmo.

À toda equipe do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) pelos diversos ensinamentos e constante disponibilidade.

Ao colega José Samuel da Silva pelos inúmeros ensinamentos e discussões, principalmente nas etapas de sequenciamento e análise estatística, bem como pela paciência e constante disponibilidade.

À FUNPAR (Fundação da Universidade do Paraná) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Laboratório de Genética Molecular Forense da Polícia Científica do Paraná por ter apoiado a realização deste estudo.

À Secretaria de Segurança Pública por ter autorizado a realização desta pós graduação.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná pelos ensinamentos acadêmicos.

Ao meu esposo Ricardo e ao meu filho Arthur por todo apoio, incentivo e compreensão durante os momentos em que estive ausente.

À Deus por sempre estar comigo, direcionando meu caminho e me dando forças para seguir adiante.

RESUMO

Na genética forense, a análise do DNA mitocondrial (mtDNA) é extremamente importante em casos envolvendo amostras muito antigas ou altamente degradadas, amostras com pouca quantidade de DNA nuclear, como pêlos e cabelos, e em casos de pessoas desaparecidas e de desastres em massa, devido a suas características peculiares (alto número de cópias, herança materna e ausência de recombinação). Neste contexto, dados genéticos populacionais são importantíssimos a fim de estabelecer a frequência de determinado haplótipo de DNA mitocondrial na população. Neste estudo, dados de alta qualidade de região de controle de mtDNA de 122 indivíduos do estado do Paraná, sul do Brasil, foram obtidos por ensaios de sequenciamento do tipo Sanger. Os diferentes haplótipos obtidos (108 haplótipos) foram classificados em haplogrupos de acordo com a árvore filogenética atualizada de mtDNA, através do software EMMA (*Estimating Mitochondrial Haplogroups Using a Maximum Likelihood Approach*). Observou-se a predominância de linhagens ameríndias com 49.2%, seguida de linhagens européias com 38.5 % e linhagens africanas com 12.3%. A diversidade de haplótipos, calculada através do software Arlequin, foi de 0.9976 e a probabilidade de coincidência aleatória foi de 0.0106, evidenciando a heterogeneidade dessa população e o alto poder de discriminação deste marcador molecular para fins de identificação forense. Este dado contribuirá para o aumento da base de dados populacional de mtDNA brasileira e está disponível no EMPOP (*European DNA Profiling Group mitochondrial DNA population database*) através do número de acesso: EMP00714.

Palavras-chave: DNA Mitocondrial, Região Controle, dados genéticos populacionais, aplicação forense, Paraná, Brasil

ABSTRACT

In forensic genetics, mitochondrial DNA (mtDNA) analysis is extremely important in cases involving very old or highly degraded samples, samples with low amounts of nuclear DNA, such as hair, and in cases of missing persons and mass disasters, due to its characteristics (high number of copies, maternal inheritance and lack of recombination). In this context, population genetic data are extremely important in order to establish the frequency of a determined mitochondrial DNA haplotype in the population. In this study, high-quality mtDNA control region data from 122 individuals from Paraná state, southern Brazil, were obtained by Sanger-type sequencing assay. The different haplotypes obtained (108 haplotypes) were classified in haplogroups according to the updated phylogenetic tree of mtDNA, through EMMA (Estimating Mitochondrial Haplogroups Using a Maximum Likelihood Approach) software. The predominance of Amerindian lineages was observed with 49.2%, followed by European lineages with 38.5 % and African lineages with 12.3%. The diversity of haplotypes, calculated using the Arlequin software, was 0.9976 and the probability of random match was 0.0106, evidencing the heterogeneity of this population and the high discrimination power of this molecular marker for the purposes of forensic identification. This data will contribute to increase the Brazilian mtDNA population database and it is available in the EMPOP (European DNA Profiling Group mitochondrial DNA population database) through the accession number: EMP00714.

Keywords: Mitochondrial DNA, Control region, Genetic population data, forensic application, Paraná, Brazil

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESTRUTURA DO GENOMA MITOCONDRIAL HUMANO	10
FIGURA 2 – HERANÇA MATERNA DO DNA MITOCONDRIAL.....	14
FIGURA 3 – HETEROPLASMIA DE SEQUÊNCIA.....	16
FIGURA 4 – INFLUÊNCIA DAS HETEROPLASMIAS DE COMPRIMENTO NA QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS.....	18
FIGURA 5 – FILOGENIA SIMPLIFICADA DO DNA MITOCONDRIAL HUMANO.....	22
FIGURA 6 – RESUMO DAS ETAPAS DO PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS EM ANÁLISES FORENSES, ENVOLVENDO O DNA MITOCONDRIAL	26

LISTA DE ABREVIATURAS

CRS - *Cambridge Reference Sequence*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EMMA - *Estimating Mitochondrial Haplogroups Using a Maximum Likelihood Approach*

EMPOP - *European DNA Profiling Group mitochondrial DNA population database*

EXO I - Enzima exonuclease I

HLA - Antígeno Leucocitário Humano

HV1- Região Hipervariável 1

HV2 - Região Hipervariável 2

HV3 - Região Hipervariável 3

mtDNA – DNA mitocondrial

ng - nanograma

pb –pares de bases

PCR - Reação em cadeia da polimerase

rCRS - *Cambridge Reference Sequence* revisada

RNA - Ácido Ribonucleico

RNAr – RNA ribossômico

RNA_t – RNA transportador

SAM - *String-based Search Algorithm*

SAP - Enzima Fosfatase Alcalina de Camarão

STRs – Repetições curtas em tandem

μL - Micro litro

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1.1	ESTRUTURA DO DNA MITOCONDRIAL HUMANO.....	9
1.2	SEQUENCIAMENTO E NOMENCLATURA	11
1.3	CARACTERÍSTICAS DO DNA MITOCONDRIAL HUMANO	12
1.3.1	Número de cópias e susceptibilidade à degradação.....	12
1.3.2	Taxa de mutação	13
1.3.3	Modo de herança	13
1.3.4	Heteroplasmia.....	15
1.3.4.1	Heteroplasmia de sequência.....	15
1.3.4.2	Heteroplasmia de comprimento e os desafios no alinhamento	17
1.4	FILOGENIA DO DNA MITOCONDRIAL	20
1.5	A UTILIZAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL HUMANO NA ÁREA FORENSE	22
1.5.1	A região controle do mtDNA e sua importância na área forense.....	23
1.5.2	Processo de trabalho com o mtDNA na área forense	25
1.5.3	A importância de dados genéticos populacionais	26
1.6	A MISCIGENAÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA	27
1.7	A DIVERSIDADE GENÉTICA DO DNA MITOCONDRIAL NO BRASIL	29
2	OBJETIVOS GERAIS	32
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	JUSTIFICATIVA.....	33
4	ARTIGO	34
5	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ESTRUTURA DO DNA MITOCONDRIAL HUMANO

O DNA mitocondrial (mtDNA) humano consiste em uma molécula de DNA circular, fita dupla, contendo aproximadamente 16.569 pares de bases (pb), podendo este número variar devido a pequenas deleções ou inserções. As fitas do mtDNA são denominadas de filamento H (heavy ou H-strand) e de filamento L (light ou L-strand). O filamento H foi assim denominado, pois apresenta maior quantidade do nucleotídeo guanina (G) em sua composição, o qual apresenta o maior peso molecular entre os nucleotídeos. O DNA mitocondrial humano é formado por uma região codificadora e uma região não codificadora, denominada Região Controle ou D-loop (“Displacement Loop”). Esta parte do DNA mitocondrial foi denominada região controle, pois contém promotores para a transcrição de genes presentes em ambas as fitas do DNA mitocondrial, bem como apresenta a origem da replicação da fita pesada do mtDNA (HOLLAND & PARSONS, 1999). A fita pesada e a fita leve apresentam diferentes direções e origens de replicação, conforme pode ser observado na figura 1. Isto ocorre pois, o início da síntese da fita leve ocorre somente após a exposição desta região pela síntese da fita H (ANDERSON et al, 1981). A região controle ou “D-loop” é assim denominada, pois durante a fase inicial de replicação do mtDNA, a nova fita, recém sintetizada se desprende da fita molde formando uma “bolha” ou “loop”, a qual pode ser visualizada através de microscopia eletrônica. (HOLLAND & PARSONS, 1999).

Na região codificadora estão presentes 37 genes, os quais codificam para treze proteínas, dois RNAs ribossômicos e vinte e dois RNAs transportadores. Os produtos destes trinta e sete genes estão relacionados ao processo de fosforilação oxidativa da mitocôndria e produção de energia celular. As treze proteínas compreendem (BUTLER, 2012): NADH desidrogenase 1 (ND1), NADH desidrogenase 2 (ND2), NADH desidrogenase 3 (ND3), NADH desidrogenase 4 (ND4), NADH desidrogenase 4L (ND4L), NADH desidrogenase 5 (ND5), NADH desidrogenase 6 (ND6), citocromo c oxidase 1 (COI), citocromo c oxidase 2 (COII) e citocromo c oxidase 3 (COIII), ATP sintase 6 (ATP6), ATP sintase 8 (ATP 8) e

1.2 SEQUENCIAMENTO E NOMENCLATURA

O DNA mitocondrial humano foi sequenciado pela primeira vez em 1980 no Laboratório de Frederick Sanger em Cambridge, na Inglaterra. A sequência obtida foi denominada *Cambridge Reference Sequence* (CRS) (ANDERSON *et al.*, 1981). Em 1999, utilizando-se de uma tecnologia de sequenciamento mais avançada, resultado de duas décadas de estudo e inovação, o material original (proveniente de uma placenta) foi sequenciado novamente. Foram observadas onze diferenças na região codificante do DNA mitocondrial e nenhuma diferença na região não codificante (ANDREWS *et al.*, 1999).

A nomenclatura universal para sequências de mtDNA tem como base a primeira sequência completa publicada e posteriormente revisada. Assim, as posições nucleotídicas, numeradas de 1 a 16569, iniciando próximo da origem de replicação da fita H, foram mantidas (TULLY *et al.*, 2001).

A sequência referência *Cambridge Reference Sequence* revisada (rCRS) é utilizada para comparação e alinhamento das novas sequências de mtDNA. Somente as diferenças entre a amostra analisada e a rCRS são anotadas. Por exemplo, na posição 16311 na rCRS encontra-se uma timina (T). Entretanto, em alguns indivíduos, este nucleotídeo pode ter sido substituído por uma citosina (C). Esta sequência é nomeada como 16311C. Todas as outras posições são entendidas como sendo idênticas à rCRS (BUDOWLE *et al.*, 2003), conforme quadro abaixo:

Exemplo de substituição e sua respectiva nomenclatura

rCRS: 5' AGTACATAAA 3'

Amostra: 5' AGC**C**ACATAAA 3' 16311C

As inserções são descritas colocando um ponto após a última base alinhada com a rCRS e então listando as inserções com os nucleotídeos observados, precedidos de algarismos em ordem numérica (BUDOWLE *et al.*, 2003). Por exemplo, se uma citosina estiver presente após a posição 309, devido à uma inserção, esta diferença de alinhamento em relação a rCRS é descrita como 309.1C. Se duas citosinas forem inseridas, esta alteração é descrita como 309.1C e 309.2C, conforme observa-se no quadro a seguir:

Exemplo de duas inserções e sua respectiva nomenclatura:

rCRS: 5' AAACCCCCCTCCCCC 3'

Amostra: 5' AAACCCCC**CC**TCCCCC 3' 309.1C 309.2C

As deleções devem ser representadas por: "DEL", "del" ou "_" (PARSON *et al.*, 2014), conforme quadro abaixo:

Exemplo de deleção e sua respectiva nomenclatura:

rCRS: 5' CAGCACACACAC**ACC** 3'

Amostra: 5'CAGCACACACAC__C 3' ' 523_ 524_

1.3 CARACTERÍSTICAS DO DNA MITOCONDRIAL HUMANO

O DNA mitocondrial humano apresenta algumas características muito peculiares, como: grande número de cópias em uma única célula, alta taxa de mutação, herança exclusivamente materna, transmissão ausente de recombinação e presença de heteroplasmia entre as moléculas de DNA mitocondrial de um mesmo indivíduo (CARRACEDO *et al.*, 2000). Estas características serão abordadas de forma individual a seguir.

1.3.1 Número de cópias e susceptibilidade à degradação

O número de cópias de mtDNA no interior de uma célula varia de acordo com o tipo de tecido analisado (ROBIN & WONG, 1988). As células germinativas femininas, por exemplo, apresentam aproximadamente 100.000 cópias do genoma mitocondrial (CHEN *et al.*, 1995).

O número de cópias de mtDNA no interior de uma célula é muito alto, pois cada mitocôndria contém entre 2 e 10 cópias de mtDNA e cada célula somática pode apresentar até 1000 mitocôndrias (BUDOWLE, 2003). Devido ao número elevado de cópias de mtDNA, as análises forenses envolvendo o DNA mitocondrial necessitam de muito cuidado para evitar contaminações entre amostras. Práticas para minimizar a contaminação são frequentemente empregadas pelos laboratórios que trabalham com mtDNA (BUTLER, 2012).

Além da grande quantidade, a natureza circular do genoma mitocondrial e sua encapsulação em uma organela, torna este material genético menos susceptível à ação de exonucleases quando comparado com o genoma nuclear, apresentando assim uma maior probabilidade de estar íntegro durante as análises envolvendo amostras muito antigas ou degradadas (BUTLER, 2012).

1.3.2 Taxa de mutação

Segundo estudos, as regiões do genoma mitocondrial sofrem seis a dezessete vezes mais mutação que exemplares únicos de genes nucleares (BROWN, GEORGE & WILSON, 1979; BROWN *et al.*, 1982; WALLACE *et al.*, 1987). Isto decorre da baixa fidelidade da DNA polimerase mitocondrial e da ausência de mecanismos de reparo, os quais conferem ao DNA mitocondrial uma taxa de mutação muito maior que a taxa do DNA nuclear (BUDOWLE *et al.*, 2003).

1.3.3 Modo de Herança

O genoma mitocondrial humano é herdado maternalmente, sem recombinação, como um bloco, denominado haplótipo. Apesar dos espermatozóides possuírem algumas mitocôndrias na região do pescoço e cauda, o genoma mitocondrial masculino é destruído durante e logo após a fertilização, desaparecendo no começo da embriogênese (CUMMINS, WAKAYAMA & YANAGIMACHI, 1998; SHITARA *et al.*, 1998; SHITARA *et al.*, 2000). Desta forma, as mitocôndrias provenientes do gameta feminino, com suas moléculas de DNA, são transmitidas para toda prole independentemente de qualquer influência paterna.

Este modo de herança do mtDNA traz como consequência haplótipos de mtDNA que não são únicos para cada indivíduo, mas compartilhados entre indivíduos aparentados maternalmente (PARSON *et al.*, 2004). Com o intuito de ilustrar este modo de herança, observa-se na figura 2 a representação de uma genealogia com dezoito indivíduos e sete diferentes haplótipos de DNA mitocondrial representados pelas letras (A, B, C, D, E, F e G). O haplótipo B está sendo transmitido pelas mulheres nas quatro gerações representadas. Os homens apenas recebem das suas respectivas mães, mas não transmitem seus haplótipos de DNA mitocondrial para seus descendentes.

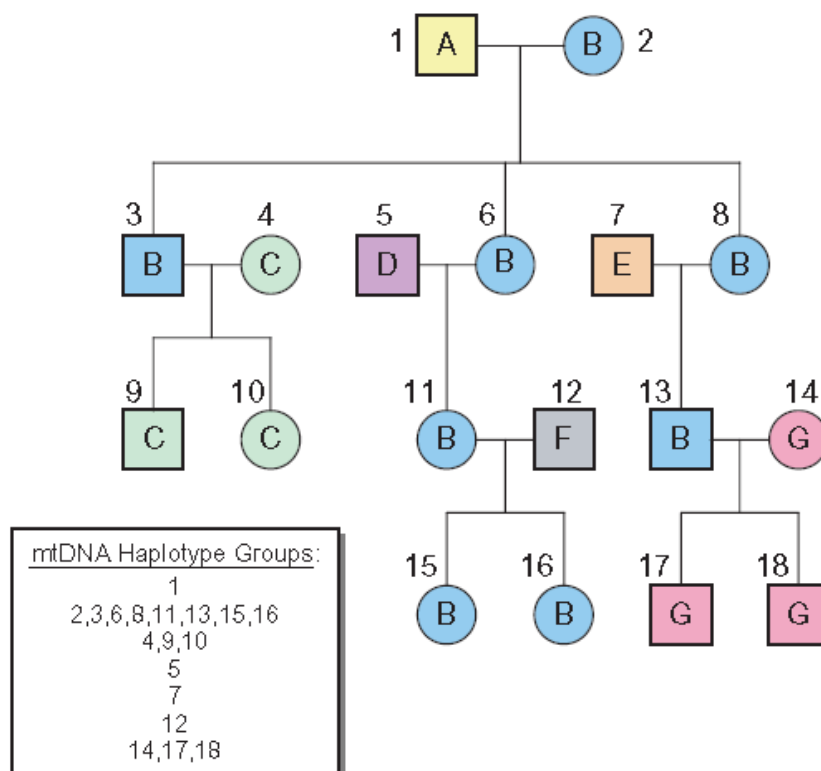


FIGURA 2: HERANÇA MATERNA DO DNA MITOCONDRIAL. HEREDOGRAMA COM DEZOITO INDIVÍDUOS, CADA QUAL COM SEU RESPECTIVO HAPLÓTIPO DE mtDNA, OS QUAIS ESTÃO REPRESENTADOS PELAS LETRAS A, B, C, D, E, F e G. (FONTE: MODIFICADO DE BUTLER, 2012).

No final dos anos 90, um artigo foi publicado mostrando evidências de recombinação do DNA mitocondrial ou herança da linha paterna e não materna (HAGELBERG *et al.*, 1999). Um ano depois, Hagelberg e colaboradores retrataram seu artigo, relatando problemas com os dados gerados naquele trabalho (HAGELBERG *et al.*, 2000).

Posteriormente, houve apenas um único relato publicado sobre a transmissão de um mtDNA humano de origem paterna, no músculo esquelético (SCHWARTZ & VISSING, 2002). O indivíduo relatado neste estudo apresentava uma miopatia mitocondrial, com 90% do seu mtDNA em células musculares de origem paterna. Este haplótipo paterno não foi encontrado em nenhum outro tecido. O sangue, o cabelo e uma cultura de fibroblastos deste indivíduo apresentavam DNA mitocondrial de origem materna.

A partir de então, vários estudos adicionais foram realizados com indivíduos que apresentavam doenças musculares semelhantes. Não foi encontrada qualquer evidência de transmissão paterna de mtDNA (JOHNS, 2003; FILOSTO *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2003).

Atualmente são mais de milhares de amostras de mtDNA confirmando o padrão de herança materna estabelecido há mais de três décadas (GILES *et al.*, 1980).

1.3.4 Heteroplasmia

Outra característica importante do DNA mitocondrial é a heteroplasmia, a qual pode ser definida como a presença de mais de um tipo de DNA mitocondrial em um indivíduo (MELTON, 2004), podendo ocorrer no mesmo tecido, mesma célula ou mesma mitocôndria (BUTLER, 2012). Esta coexistência de múltiplas moléculas de DNA mitocondrial, em uma mesma amostra, ocorre mais frequentemente em tecidos com alta atividade metabólica como, por exemplo, no tecido muscular (CALLOWAY *et al.*, 2000) e em fios de cabelo, nos quais o grau de energia requerido para a sua queratinização é bastante alto (TULLY *et al.*, 2004).

Atualmente, acredita-se que todos os indivíduos são heteroplásmicos em algum nível, porém grande parte deles o são em uma porcentagem abaixo dos níveis de detecção nas análises de sequenciamento do mtDNA (COMAS, PÄÄBO & BERTRANPETIT, 1995; BENDALL *et al.*, 1996; STEIGHNER *et al.*, 1999; TULLY *et al.*, 2000).

A heteroplasmia pode ocorrer por uma substituição de um nucleotídeo (transição ou transversão) a qual é denominada heteroplasmia de sequência, ou por inserções e/ou deleções sendo denominada heteroplasmia de comprimento (BENDALL & SYKES, 1995; BENDALL *et al.*, 1996; MELTON, 2004). Estes dois tipos de heteroplasmia diferem em causa e frequência (PARSON *et al.*, 2014)

1.3.4.1 Heteroplasmia de Sequência

A heteroplasmia de sequência (também denominada heteroplasmia de ponto) é detectada quando dois nucleotídeos são observados em uma mesma posição do DNA mitocondrial (SALAS, LAREU & CARRACEDO, 2001), conforme pode ser observado na figura 3. Estas posições heteroplásmicas devem ser relatadas seguindo as normas da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), da seguinte forma: nucleotídeos G/T=K; A/G=R; G/C=S; A/T=W; C/T=Y; A/C=M; A/G/T=D; A/C/T=H; A/C/G=V; C/T/G=B; A/C/G/T=N (FBI, 2003).

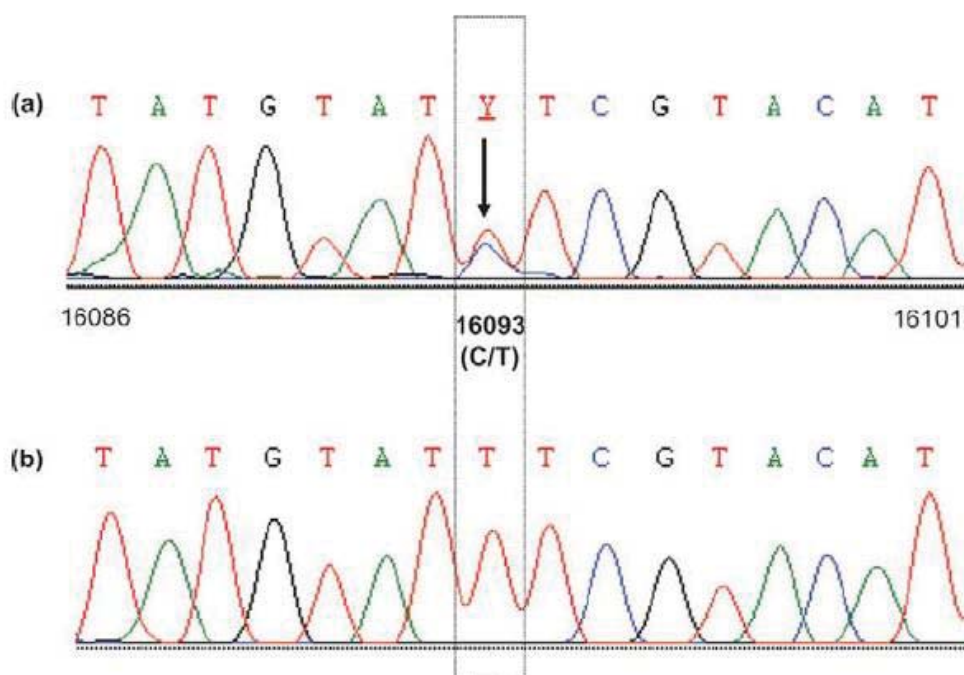


FIGURA 3: HETEROPLASMIA DE SEQUÊNCIA. SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO DO DNA MITOCONDRIAL ENTRE AS POSIÇÕES 16086 E 16101, EM DUAS AMOSTRAS DIFERENTES (a) (b). NA POSIÇÃO 16093, OBSERVA-SE NA AMOSTRA “A”, UMA HETEROPLASMIA DE SEQUENCIA (PRESENÇA DE DOIS NUCLEOTÍDEOS EM UMA MESMA POSIÇÃO), REPRESENTADA PELA LETRA Y (NUCLEOTÍDEOS CITOSINA E TIMINA) E NA AMOSTRA “B” APENAS A TIMINA (FONTE: BUTLER, 2012).

Em casos nos quais coexistam uma deleção e uma não deleção ou uma inserção e uma não inserção em uma mesma posição, a letra correspondente ao nucleotídeo presente, em letra minúscula, deve ser utilizada para indicar tal heteroplasmia (PARSON *et al.*, 2014).

As amostras com heteroplasmia de sequência comumente apresentam apenas um ponto de heteroplasmia em toda região controle do DNA mitocondrial, porém já foram observadas dois e até mesmo três pontos de heteroplasmia em uma única amostra (IRWIN *et al.*, 2009; MELTON *et al.*, 2005).

Apesar de não existir um valor definido de background para a detecção da heteroplasmia de sequência, esta deve ser relatada baseada em sequências que apresentem qualidade e, idealmente, após a confirmação da heteroplasmia no sequenciamento de ambas as fitas do DNA mitocondrial (PARSON *et al.*, 2014).

A frequência da heteroplasmia de sequência varia de acordo com a origem da amostra. Em amostras de sangue e de saliva, a frequência é de aproximadamente 6% (IRWIN *et al.*, 2009) e, em amostras de cabelo, é de 11.4%. (MELTON *et al.*, 2005). É importante salientar ainda que, as posições comumente afetadas pelas

heteroplasmas de sequência coincidem com aquelas conhecidas como “*hotspots*” para mutações (IRWIN *et al.*, 2009).

1.3.4.2 Heteroplasma de comprimento e os desafios no alinhamento

As heteroplasmas de comprimento (causadas por inserções e deleções) ocorrem predominantemente ao redor das posições 16189, 309, 315 e 573, nas quais se observam trechos de policitosina ininterruptas, e próximas da posição 524, consequência das diversas repetições dos dinucleotídeos citosina e adenina (PARSON & BANDELT, 2007). Devido à presença de um limiar de instabilidade, a heteroplasma de comprimento é tipicamente observada quando os trechos homopoliméricos excedem oito nucleotídeos (FORSTER *et al.*, 2010; PARSON *et al.*, 1998).

Os trechos de policitosina ininterruptas geralmente apresentam considerável heteroplasma de comprimento, gerando populações de mtDNA que possuem de duas a seis variantes de comprimento diferentes (BENDAL & SYKES, 1995; LUTZ *et al.*, 1998; PARSON *et al.*, 1998; PFEIFFER *et al.*, 2004). Estas populações podem ser discernidas, nos tecidos e fluidos corporais de um indivíduo, através do uso de equipamentos tecnológicos de sequenciamento mais modernos, nos quais variáveis heteroplasmáticas de baixo nível podem ser distinguidas do ruído de fundo (BRANDSTATTER & PARSON, 2003; BRANDSTATTER, NIEDERSTATTER & PARSON, 2004). É importante ressaltar ainda que, a distribuição destas variantes pode variar no mesmo tecido ou entre tecidos de um indivíduo (SALAS, LAREU & CARRACEDO, 2001).

Em casos raros, a heteroplasma de comprimento também pode ser observada em outras regiões, tais como ao redor das posições 16258, 16293, 73 e 455 ou em algumas regiões de sequência não repetitivas devido a eventos de inserção e deleção (PARSON & BANDELT, 2007).

As frequências de heteroplasma de comprimento variam de acordo com a região do DNA mitocondrial em estudo. Portanto, a frequência de heteroplasma ao redor da posição 16189 é diferente da frequência daquela da posição 309. Além disso, elas variam de acordo com a população que está sendo analisada e com a frequência de determinadas transições ou tranversões ao redor destas regiões. Isto, pois estas mutações podem gerar grandes trechos de policitosina ininterruptas,

levando a maior ocorrência de heteroplasmas de comprimento na região em questão (PARSON *et al.*, 2014).

Este tipo de heteroplasma frequentemente causa perda na qualidade da sequência, devido à presença de duas ou mais variantes de comprimento, causando o registro sobreposto dos nucleotídeos após esta região (BUTLER, 2012), conforme pode ser observado na figura 04.

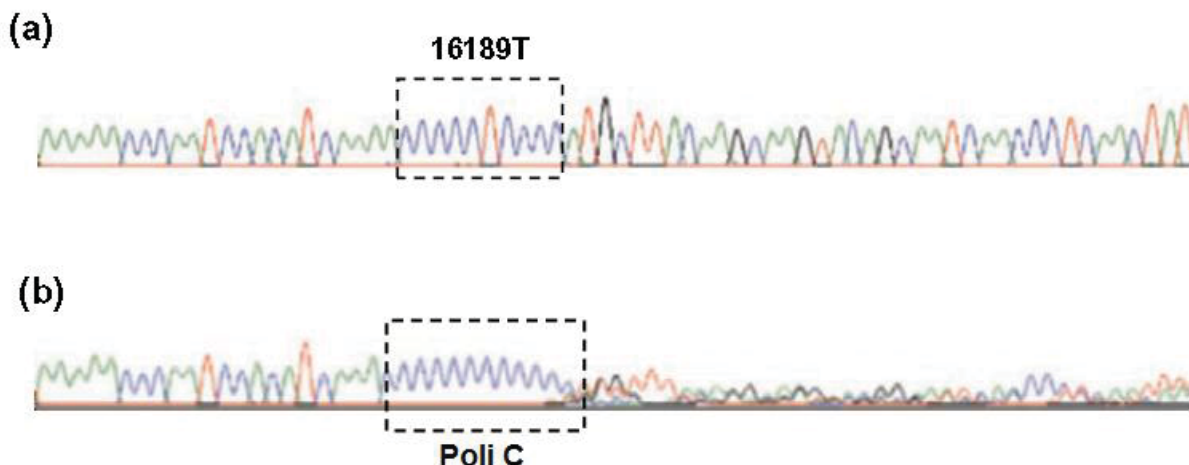


FIGURA 4: INFLUÊNCIA DAS HETEROPLAMIAS DE COMPRIMENTO NA QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS. COMPARAÇÃO DE UMA AMOSTRA “A” APRESENTANDO ALTA QUALIDADE DE SEQUÊNCIA, POIS POSSUI NA POSIÇÃO 16189 UMA TIMINA INTERROMPENDO A CADEIA DE POLI CITOSINAS NESTA REGIÃO, BEM COMO UMA AMOSTRA “B” NA QUAL A TIMINA FOI SUBSTITUÍDA POR UMA CITOSINA, DANDO ORIGEM A UMA REGIÃO COM INÚMERAS REPETIÇÕES DO NUCLEOTÍDEO C. NA AMOSTRA “B” A QUALIDADE DA SEQUÊNCIA CAI RAPIDAMENTE APÓS A SEQUÊNCIA POLI C. ISTO OCORRE PELA PRESENÇA DE DUAS OU MAIS VARIANTES DE COMPRIMENTO (HETEROPLASMA DE COMPRIMENTO), A QUAL CAUSA O REGISTRO SOBREPOSTO DOS NUCLEOTÍDEOS APÓS ESTA REGIÃO (FONTE: MODIFICADO DE BUTLER, 2012).

A perda de qualidade do sequenciamento a jusante das regiões poli C causadas pelas heteroplasmas de comprimento, levam a leitura de apenas uma das fitas do DNA mitocondrial (L ou H) a partir da região poli C em sentidos opostos. Nestes casos, preconiza-se que a amostra seja ressequenciada utilizando outros dois primers (um “forward” e um “reverse”), a fim de garantir a dupla leitura de todas as posições da região sequenciada. Embora a dupla cobertura (proveniente do sequenciamento das fitas L e H) seja recomendada, em casos de heteroplasma de comprimento a dupla leitura proveniente da mesma fita é aceitável (PARSON *et al.*, 2014).

As heteroplasmas de comprimento causam problemas não apenas no sequenciamento do DNA mitocondrial, mas também no alinhamento e na nomenclatura das sequências (PARSON & BANDELT, 2007). Isto ocorre, pois

nestes casos um mesmo haplótipo de DNA mitocondrial pode ser nomeado de diferentes formas.

Assim, buscando padronizar a nomenclatura em regiões variáveis de comprimento, em 2002 foram estabelecidas as seguintes regras: I - caracterizar os perfis usando o menor número de diferenças quando comparado com a rCRS; II – se houver mais de uma forma de manter o mesmo número de diferenças, estas devem ser priorizadas da seguinte maneira: a) indels; b) transições; c) transversões; III – inserções e deleções devem ser colocadas na posição mais próxima à extremidade 3' da fita leve. Além disso, as inserções e deleções devem ser combinadas em situações em que o mesmo número de diferenças é mantido. Estas recomendações são hierárquicas. Assim, a recomendação I deve anteceder as recomendações II e III (WILSON *et al.*, 2002a e 2002b).

Porém com o crescente aumento no número de dados populacionais disponíveis nos últimos anos, houve uma melhora significativa no entendimento da filogenia mitocondrial mundial, revelando que a aplicação das regras de alinhamento anteriormente sugeridas poderia resultar em atribuições controversas de haplótipos, bem como em nomenclaturas não compatíveis com a filogenia mitocondrial (BANDELT & PARSON, 2008).

Assim, em 2014 foram publicadas as novas recomendações da Sociedade Internacional de Genética Forense, as quais estabelecem que o alinhamento e a anotação das sequências de mtDNA devem ser realizados de acordo com a filogenia mitocondrial (padrões estabelecidos de mutações) (PARSON *et al.*, 2014). Portanto, sugere-se que as antigas diretrizes sejam substituídas pelas seguintes:

- Lei Filogenética: As sequências devem ser alinhadas de acordo com o conhecimento atual da filogenia. Em casos de múltiplas soluções igualmente plausíveis, deve-se optar por aquela que apresentar a máxima parcimônia. As variantes que flanqueiam longas regiões poliC, no entanto, estão sujeitas a convenções próprias, devido às heteroplasmias de comprimento, as quais são relatadas no próximo item;
- Convenções para as regiões poli C: As regiões poli C de HV1 e HV2 devem sempre ser marcadas com 16189C e 310C respectivamente, de modo que subseqüentes interrupções da cadeia poli C, devido a novas alterações de C para T, sejam codificadas pela transição correspondente. Variações de comprimento

da pequena cadeia poli A que precede a posição 16184 devem ser anotadas como transversão;

- Pontos de indel: Inserções e deleções devem ser anotadas na extremidade 3' da fita leve a menos que a filogenia sugira outra forma (BANDELT & PARSON, 2008).

Estas regras devem ser obedecidas para a correta nomenclatura dos haplótipos, bem como para a fiel comparação de um haplótipo novo recém sequenciado com os outros sequenciamentos de DNA mitocondrial anteriormente publicados.

1.4 FILOGENIA DO DNA MITOCONDRIAL

Todos os tipos de mtDNA humano podem, em última análise, ser rastreados de volta a um antepassado matrilinear comum que viveu há aproximadamente 200.000 anos na África (BEHAR *et al.*, 2008; MACAULAY *et al.*, 2005; MISHMAR *et al.*, 2003).

A alta taxa de evolução do mtDNA levou à variações de sequência, geradas pelo acúmulo sequencial de novas mutações ao longo da dispersão humana em diferentes partes do mundo. Estas variações podem ser representadas em uma árvore que reflete as relações filogenéticas de variantes conhecidas de mtDNA (VAN OVEN & KAYSER, 2009).

As linhagens de DNA mitocondrial são conhecidas como haplogrupos. Cada haplogrupo é formado por um conjunto de haplótipos que apresentam algumas características em comum, que os definem como tendo uma ancestralidade compartilhada (BUDOWLE *et al.*, 2003).

A importância de uma filogenia de mtDNA global detalhada foi relatada por vários autores (BANDELT *et al.*, 2005, 2006; KIVISILD *et al.*, 2006a; KONG *et al.*, 2006; RICHARDS, 2004; SALAS *et al.*, 2007; TORRONI *et al.*, 2006).

Em 2008, uma árvore filogenética da variação de mtDNA obtida a partir de todos os dados de sequência disponíveis (4198 sequências de genoma completo de mtDNA e outras 945 sequências da região codificante disponíveis no banco de dados NCBI GenBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>) foi gerada. Esta abrangente árvore filogenética de mtDNA, representa uma nomenclatura universal dos haplogrupos, a

qual é atualizada frequentemente e pode ser acessada no site <http://www.phylotree.org> (VAN OVEN & KAYSER, 2009).

Os primeiros haplogrupos de mtDNA, descobertos em nativos americanos, foram denominados A, B, C e D (TORRONI *et al.*, 1993). Posteriormente, outros haplogrupos detectados foram designados usando outras letras do alfabeto. Até agora, todas as letras do alfabeto foram utilizadas, exceto a letra O. PALANICHAMY e colaboradores (2004) propuseram este rótulo para um haplogrupo que mais tarde foi renomeado como N12 por HUDJASHOV e colaboradores (2007).

Os haplogrupos denominados com a letra L pertencem às linhagens mais antigas, provenientes da África, indicando a origem africana do homem moderno, bem como o êxodo deste continente, conforme indicam outros dados genéticos e fósseis (VAN OVEN & KAYSER, 2009).

O haplogrupo L3 deu origem aos macrohaplogrupos M, N e R (sendo o último, uma subdivisão de N), os quais abrangem todas as variações observadas fora da África (ver figura 5). A nomenclatura evoluiu de tal maneira que as letras C, D, E, G, Q e Z designam linhagens pertencentes ao macrohaplogrupo M; as letras A, I, S, W, X e Y linhagens pertencentes ao macrohaplogrupo N; e as linhagens B, F, HV, H, J, K, P, T, U e V pertencentes ao macrohaplogrupo R (VAN OVEN & KAYSER, 2009).

Existem outras linhagens descendentes, subdivisões de um haplogrupo em particular, para as quais não foram reservadas letras alfabéticas únicas. Estes haplogrupos foram marcados com um asterisco na figura 5. Por exemplo, N* significa N5, N12, N13, N14, N21 e N22 (VAN OVEN & KAYSER, 2009).

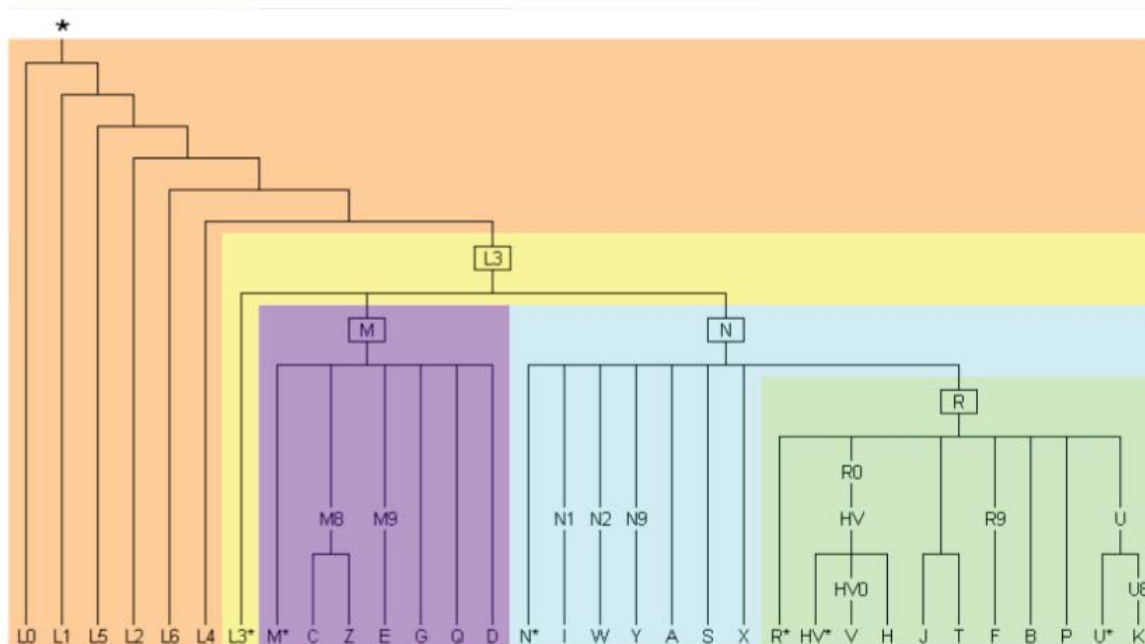


FIGURA 5 - FILOGENIA SIMPLIFICADA DO DNA MITOCONDRIAL HUMANO, MOSTRANDO O USO DE LETRAS DO ALFABETO PARA A DESIGNAÇÃO DE HAPLOGRUPOS. A RAIZ DA ÁRVORE É INDICADA POR UMA ESTRELA QUE REPRESENTA O ANTEPASSADO MATRILINEAR COMUM MAIS RECENTE DE TODOS OS HUMANOS. CUMPRE REFERIR QUE ESTA FIGURA NÃO ILUSTRA TODA VARIAÇÃO GLOBAL DE DNA MITOCONDRIAL HUMANO (A QUAL PODE SER ACESSADA EM [HTTP://WWW.PHYLOTREE.ORG](http://www.phylotree.org)), ELA APENAS MOSTRA A TOPOLOGIA ALFABÉTICA DOS HAPLOGRUPOS (FONTE: VAN OVEN & KAYSER, 2009).

Os haplogrupos A, B, C, D, E, F, G e M são tipicamente associados a populações asiáticas, enquanto a maioria dos nativos americanos (ameríndios) pertencem aos haplogrupos A, B, C, D e E. Isto ocorre pois os ameríndios são uma sub-população daquela originária do continente asiático. Os haplogrupos L0, L1, L2 e L3 são africanos. Os haplogrupos H, I, J, K, T, U, V, W e X são tipicamente associados a populações europeias (WALLACE, BROWN & LOTT, 1999).

1.5 A UTILIZAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL HUMANO NA ÁREA FORENSE

O sequenciamento do DNA mitocondrial é uma ferramenta válida e confiável, utilizada em casos forenses quando o DNA nuclear não fornece resultados conclusivos. A análise do mtDNA pode ser utilizada em uma série de tecidos, como pêlos, que por sua natureza contem pouco DNA nuclear, e ossos e dentes, que dependendo das circunstâncias podem conter pouca quantidade de DNA nuclear,

mostrando-se uma importante ferramenta na genética forense (WILSON *et al.*, 1995). Resultados têm sido obtidos rotineiramente de um simples pêlo, com um a dois centímetros de comprimento (BUDOWLE *et al.*, 2003).

Além disso, o sequenciamento do mtDNA foi também a primeira ferramenta utilizada na identificação dos remanescentes ósseos de soldados americanos que lutaram na Guerra do Vietnam (HOLLAND *et al.*, 1993). As vítimas da tragédia ocorrida em 11 de setembro de 2001, no World Trade Center, também foram identificadas através do sequenciamento do mtDNA (HOLLAND *et al.*, 2003).

A presença de um grande número de cópias por célula torna a análise do mtDNA extremamente útil em casos cujo rendimento da extração do DNA nuclear é muito pequeno ou naqueles em que o DNA nuclear encontra-se degradado. Nestes casos forenses, é mais provável que sejam obtidos resultados do mtDNA do que de marcadores polimórficos do DNA nuclear (BUDOWLE *et al.*, 2003).

Além do número de cópias, o padrão de herança materno do DNA mitocondrial pode ter grande valia em alguns casos forenses, principalmente naqueles envolvendo pessoas desaparecidas, pois diversos parentes maternos podem fornecer a amostra de referência para comparação direta com o DNA mitocondrial presente na amostra questionada, devido à ausência de recombinação (HOLLAND *et al.*, 1993).

1.5.1 A região controle do mtDNA e sua importância na área forense

Segundo estudos, a taxa de mutação na região controle (posições 16024-576) é cerca de dez vezes maior do que a taxa da região codificante (bases 577-16023) (HOWELL *et al.*, 2007; PAKENDORF & STONEKING, 2005). Devido à maior taxa de mutação, a região controle é enriquecida em variabilidade e, portanto, tem grande importância na área forense.

Porém dentro da própria região controle, existem diferenças locais na taxa de mutação entre as posições nucleotídicas (HASEGAWA *et al.*, 1993; MEYER *et al.*, 1999). Alguns sítios individuais atuam como pontos quentes de mutação (por exemplo, as posições: 146, 150, 152, 195, 16189, 16311, 16362 e 16519), enquanto outros aparecem bastante estáveis (posições 477, 493, 16108, 16219) (VAN OVEN & KAYSER, 2009). Conhecer as posições mais estáveis, bem como aquelas que

atuam como “*hotspots*” para mutação, é bastante importante na interpretação dos dados e conclusão dos casos forenses.

Embora vários autores tenham abordado as possíveis causas da hipermutabilidade de algumas posições do mtDNA (GALTIER *et al.*, 2006; HOWELL *et al.*, 2007; INGMAN E GYLLENSTEN, 2007; KIVISILD *et al.*, 2006b; MALYARCHUK *et al.*, 2002), seu exato mecanismo continua a ser elucidado.

De acordo com a frequência de posições polimórficas, foram identificadas na região controle do DNA mitocondrial (posições 16024-576), três regiões hipervariáveis, nas quais a frequência das posições polimórficas é mais alta. A região HV1 compreende da posição 16024 a 16365 apresentando 342 pb (pares de bases), HV2 compreende da posição 73 a 340 com 268 pb e HV3, da posição 438 a 574, com 137 pb (LUTZ *et al.*, 1997).

A diversidade dessas regiões hipervariáveis foi demonstrada em um estudo populacional, com duzentos indivíduos não aparentados, em que foi sequenciada a região controle do mtDNA (LUTZ *et al.*, 1998). Nesse estudo foram verificadas 88 posições polimórficas de um total de 342 nucleotídeos da região HV1 (totalizando 26% de diversidade nessa região); a região HV2 mostrou 65 posições polimórficas de um total de 268 nucleotídeos (totalizando 24% de diversidade) e a região HV3 apresentou 25 posições polimórficas de um total de 137 nucleotídeos (totalizando 18% de diversidade). Ainda na região controle, porém fora das regiões hipervariáveis, foi observada uma taxa menor de variabilidade, 7% entre as posições 16366-16569 e 1-72 e 3% entre as posições 341-437 (LUTZ *et al.*, 1998).

As regiões HV1 e HV2 foram amplamente estudadas e utilizadas na área forense, em casos de identificação humana. No final da década de 1990, descobriu-se a região hipervariável 3, a qual passou a ser utilizada também em casos forenses. Em uma análise com 904 sequências de DNA mitocondrial de indivíduos da Alemanha, Áustria e Suíça, esta região foi responsável por diferenciar um quinto das sequências que se mostravam idênticas nas regiões HV1 e HV2 (LUTZ *et al.*, 2000).

A região HV3 inclui algumas posições importantes para determinação de alguns haplogrupos da Eurásia (ACHILLI *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2006), aumentando assim o poder de discriminação das análises forenses, como a transversão 447G no haplogrupo M2 e as transições nas posições 456 (H5), 461 (M6), 462 (J1), 482 (M3,

J1c1), 489 (M, J), 497 (K1a), 499 (B4b, U409) e 508 (U2e) (PARSON & BANDELT, 2007).

Contudo, diversos estudos relatam que a análise separada das duas ou três regiões hipervariáveis de uma amostra de mtDNA tem inerentemente o risco de mistura dessas regiões entre diferentes mtDNAs, levando a recombinantes artificiais (BANDELT, MACAULAY & RICHARDS, 2000; BANDELT *et al.*, 2001; PARSON *et al.*, 2004; BANDELT, SALAS & LUTZ-BONENGEL, 2004).

Portanto, atualmente, preconiza-se que toda a região controle do DNA mitocondrial seja sequenciada em estudos genéticos de populações para fins forenses (PARSON *et al.*, 2014). A análise de toda região controle aumenta a diversidade de haplótipos, bem como possibilita a melhor determinação do haplogrupo, a que pertence determinado haplótipo (PRIETO *et al.* 2011; PRIETO *et al.* 2013).

1.5.2 Processo de trabalho com o mtDNA na área forense

O processo de trabalho com DNA mitocondrial para análises forenses envolve os seguintes passos: extração do DNA, reação de PCR, sequenciamento em ambas as direções, confirmação das sequências através da dupla leitura (fitas “forward” e “reverse”) e comparação com a rCRS, anotando as diferenças para estabelecimento do haplótipo. Este processo deve ser realizado tanto para a amostra conhecida (proveniente de um suspeito, em casos de local de crime, ou de um parente materno, em casos de identificação humana), quanto para a amostra questionada (proveniente de material biológico coletado em uma cena de crime ou de remanescentes do cadáver em casos de identificação humana). A amostra conhecida deve ser processada separadamente e preferencialmente depois da amostra questionada estar concluída, a fim de evitar contaminações cruzadas, dada a disparidade de qualidade e quantidade de DNA entre estas diferentes categorias de amostras. Quando ambas estiverem finalizadas, então é realizada a comparação entre elas (BUTLER, 2012). A figura a seguir mostra o passo a passo do processamento das amostras em análises forenses envolvendo o DNA mitocondrial:

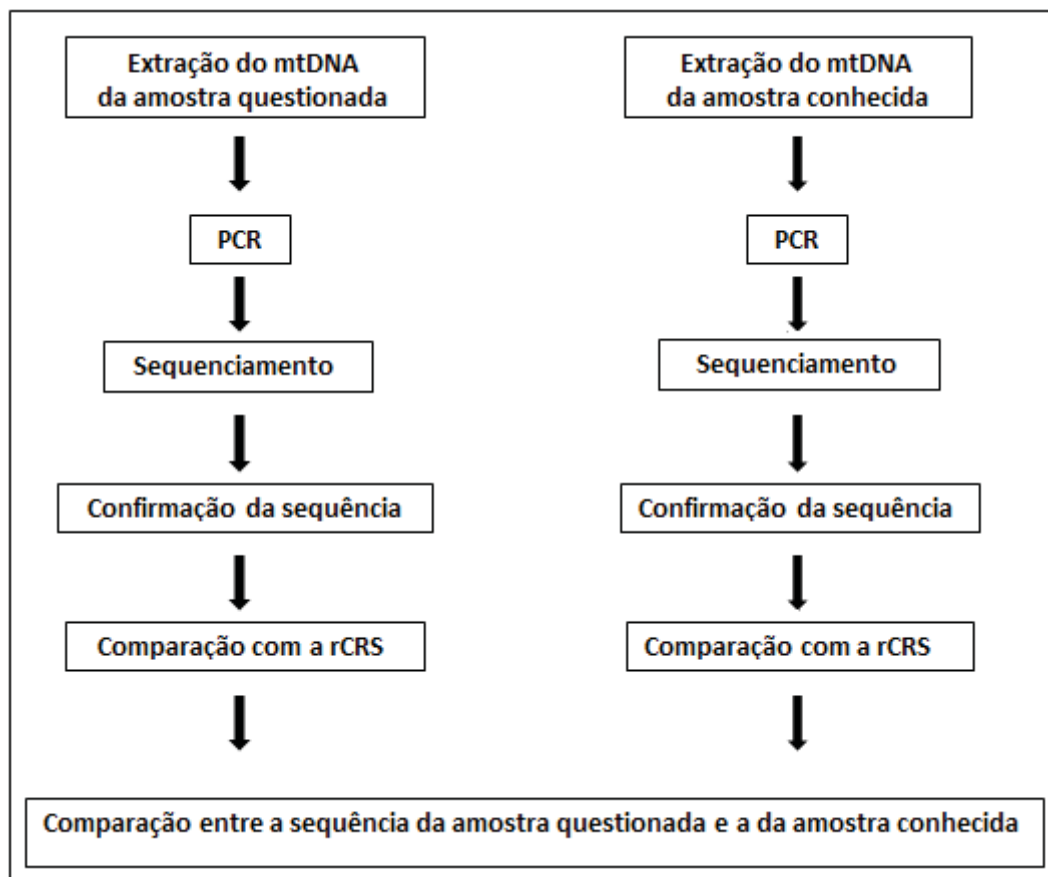


FIGURA 6: RESUMO DAS ETAPAS DO PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS EM ANÁLISES FORENSES, ENVOLVENDO O DNA MITOCONDRIAL (FONTE: MODIFICADO DE BUTLER, 2012).

A análise do mtDNA é uma poderosa ferramenta para excluir as amostras como sendo originárias do mesmo indivíduo ou mesma linhagem matrilinea. Porém se duas amostras não puderem ser excluídas, o significado desta correspondência deve ser avaliado fazendo referência à abundância dessa sequência de mtDNA (haplótipo) em uma população relevante (PARSON *et al.*, 2004).

1.5.3 A importância de dados genéticos populacionais

Os dados genéticos populacionais exercem um papel fundamental na estimativa da frequência de determinado haplótipo de mtDNA na população, estabelecendo assim o peso desta evidência forense (BUDOWLE *et al.*, 2003).

Com o intuito de desenvolver uma base de dados populacional com alta qualidade, para uso forense e para casos de identificação humana, a comunidade europeia forense de sequenciamento de DNA mitocondrial criou o EMPOP (*European DNA Profiling Group mitochondrial DNA population database*). Este

projeto reúne milhares de sequências de mtDNA que podem ser acessadas no site <http://www.empop.org> (PARSON & DUR, 2007).

O EMPOP tem por objetivo a coleta, o controle de qualidade e a apresentação de haplótipos de mtDNA de todo o mundo para pesquisa e consulta (PARSON & DUR, 2007). Ele utiliza o SAM (*String-based Search Algorithm*), um algoritmo de pesquisa baseado em cadeias de nucleotídeos, o qual converte as sequências para consulta e a base de dados em cadeias de nucleotídeos sem alinhamento e, assim, elimina a possibilidade de sequências idênticas não serem identificadas em uma consulta ao banco de dados. Assim, se duas sequências idênticas de mtDNA forem traduzidas em diferentes haplótipos, elas serão identificadas como iguais, eliminando a possibilidade de uma subestimação das frequências absolutas e relativas e, conseqüentemente, de uma superestimação do poder estatístico da evidência (ROCK *et al.*, 2011).

Para a atribuição de haplogrupos aos haplótipos de DNA mitocondrial, o EMPOP utiliza o EMMA (Estimating Mitochondrial Haplogroups Using a *Maximum Likelihood Approach*), um algoritmo para estimar o haplogrupo de sequência de mtDNA considerando 14.990 genomas de DNA mitocondrial completos do banco de dados do GenBank e 3.925 haplótipos virtuais do Phylotree. Além disso, 19.171 haplótipos da região controle são utilizados para realizar uma estimativa da máxima verossimilhança da estabilidade de mutações (ROCK *et al.*, 2013).

Recentemente, o conselho da Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG) e os editores das revistas: *Forensic Science International: Genetics* e *Internacional Journal of Legal Medicine*, convidaram o EMPOP para realizar o controle de qualidade (QC) dos dados de mtDNA, presentes em artigos que serão submetidos a estas revistas. Assim, os autores devem enviar a nomenclatura das sequências de mtDNA e seus respectivos haplogrupos para o EMPOP previamente à submissão do artigo.

1.6 A MISCIGENAÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Os brasileiros formam uma das populações mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de cruzamentos interétnicos entre povos de três continentes: os colonizadores europeus, representados principalmente pelos

portugueses, africanos escravizados e os ameríndios autóctones (ALVES-SILVA *et al.*, 2000).

Quando os portugueses chegaram ao Brasil, em 1500, havia aproximadamente 2,5 milhões de indígenas vivendo aqui (SALZANO & FREIRE-MAIA, 1970; BETHELL, 1997). A mistura português-ameríndia começou logo após a chegada dos primeiros colonizadores. O cruzamento entre homens europeus e mulheres indígenas tornou-se frequente, sendo inclusive encorajado como estratégia de crescimento populacional e ocupação colonial do país (MÖRNER, 1967).

Os africanos foram trazidos para o Brasil no século 16, escravizados para trabalhar em fazendas de cana-de-açúcar, nas minas de ouro e diamante e nas plantações de café. Os registros históricos sugerem que entre 1551 e 1850 (quando o tráfico de escravos foi abolido), aproximadamente 3,5 milhões de africanos foram trazidos para o Brasil (SALZANO & FREIRE-MAIA, 1967; CURTIN 1969; RIBEIRO, 1995).

Quanto à imigração européia, estima-se que cerca de 500.000 portugueses chegaram ao país entre 1500 e 1808 (SALZANO & FREIRE-MAIA, 1967). A partir de então, depois que os portos brasileiros foram legalmente abertos a todas as nações amigas, o Brasil recebeu um número crescente de imigrantes de várias partes do mundo. Portugal permaneceu sendo a fonte mais importante de imigrantes, seguida da Itália, Espanha e Alemanha.

No século 20, ocorreu a imigração asiática, principalmente do Japão, bem como do Líbano e da Síria. Estima-se assim que, 58% dos imigrantes que chegaram no Brasil entre 1500 e 1972 eram europeus, 40% eram africanos e 2% eram asiáticos (CALLEGARI-JACQUES & SALZANO, 1999).

Portanto, observa-se que o Brasil é um país com uma grande extensão geográfica e uma população altamente miscigenada, resultante de sua própria colonização e de cinco séculos de imigração (SALZANO & FREIRE-MAIA, 1967). Concomitantemente, observa-se que a contribuição de cada uma das três linhagens (européia, africana e nativo americana) na formação da população brasileira se deu de forma não homogênea pelo território nacional.

A formação da população do Estado do Paraná também é tri-híbrida, com a contribuição de ameríndios, africanos e europeus. Antes do descobrimento do Brasil, o Paraná era habitado por tribos indígenas (tupiguaranis, caingangues e xoclungues (WACHOWICZ, 1995). No século XVI, parte do território, que hoje corresponde ao

Estado do Paraná, pertencia à coroa espanhola, sendo colonizado primeiramente pelos jesuítas. Posteriormente, este território passou a fazer parte de Portugal. No século XVIII, os africanos começaram a ser utilizados como mão-de-obra escrava. Em 1798, o número de africanos superava o dos índios. Na segunda metade do século XIX, muitos imigrantes vindos da Europa se estabeleceram no Paraná: italianos, alemães, poloneses e em menor quantidade ingleses, franceses e suíços. Com a vinda destes imigrantes, bem como com a abolição da escravatura (1888), a proporção de africanos na população do Estado do Paraná diminuiu muito (WACHOWICZ, 1995), fazendo com que a contribuição de negros africanos à população de Curitiba e do Paraná como um todo, não fosse tão pronunciada como em outros estados do Brasil (CULPI e SALZANO, 1984).

Através de outro sistema genético (HLA), foi possível verificar a contribuição de cada grupo populacional na composição étnica da população do estado do Paraná através de análise do grau de miscigenação (PROBST *et al.*, 2000; BRAUN-PRADO *et al.*, 2000). Nesses estudos demonstra-se que, assim como os indivíduos classificados como mulatos, os brancos e negros também são mestiços. Segundo o estudo de PROBST *et al.* (2000), a população classificada fenotipicamente como branca apresenta origem predominantemente europeia (80.6%), com uma menor contribuição de genes africanos (12.5%) e ameríndios (7.0%). A população mulata é composta por ascendência africana (49.5%) e europeia (41.8%), com uma menor contribuição de genes ameríndios (8.7%). No estudo de BRAUN-PRADO *et al.* (2000) foi visto que a população negra, da cidade de Curitiba - capital do estado do Paraná, apresentava uma origem predominantemente africana (74%), mas com uma contribuição significativa de genes europeus (25%) e apenas 1% de genes ameríndios.

1.7 A DIVERSIDADE GENÉTICA DO DNA MITOCONDRIAL NO BRASIL

Segundo estudos realizados com o DNA mitocondrial, buscando estabelecer a ancestralidade da linhagem materna da população brasileira, foram observadas contribuições de 33% de ameríndios, 28% de africanos e 39% de europeus, porém com proporções variáveis de acordo com a colonização de cada região do Brasil (PENA *et al.*, 2000). Ao analisar cada região separadamente, foi observada a

predominância da matrilinearidade africana (44%) no Nordeste. No norte, onde a presença indígena é elevada, 54% das matrilineagens foram ameríndias. O Sudeste foi a região que apresentou a distribuição destas três linhagens de forma mais uniforme. No sul, 66% dos haplótipos eram europeus, refletindo a ampla imigração da Europa para esta região nos séculos 19 e 20 (PENA *et al.*, 2000).

Dentre os haplótipos europeus encontrados no Brasil, houve a predominância daqueles pertencentes aos haplogrupos H, T e J. Já entre os haplótipos africanos, predominaram os haplogrupos L3e e L1c. Na linhagem ameríndia foram observados haplótipos pertencentes aos haplogrupos A, B, C e D (PENA *et al.*, 2000).

Existem ainda, alguns estudos regionais realizados com DNA mitocondrial no Brasil que, além de relatar a ancestralidade materna, fornecem através de análises estatísticas a diversidade genética e a probabilidade de coincidência aleatória (a probabilidade de dois indivíduos desta população selecionados aleatoriamente apresentarem o mesmo haplótipo de DNA mitocondrial). Estes dados são muito importantes nas análises genéticas forenses, as quais tem por finalidade a identificação através de características individuais.

Segundo um estudo realizado com 243 indivíduos afrodescendentes provenientes de sete populações da Região da Amazônia, analisando apenas a região HV1 do DNA mitocondrial, foi observada uma diversidade de sequência (H) de 0.9898 ± 0.0016 e uma probabilidade de coincidência aleatória de 0.012 (RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2007).

No estado de Alagoas, foi realizado outro estudo com 167 indivíduos, no qual foram analisadas as regiões HV1 e HV2, obtendo-se um valor de H de 0.9975 ± 0.0012 e uma probabilidade de coincidência aleatória de 0.0084 (BARBOSA *et al.*, 2008).

No Rio de Janeiro, um estudo com 190 indivíduos nascidos na região metropolitana da capital, no qual foram analisadas apenas as regiões HV1 e HV2, mostrou uma diversidade de sequência de 0.9994 ± 0.0006 , com uma predominância de 57.9% da matrilinearidade de procedência africana (BERNARDO *et al.*, 2014). Os dados relacionados à probabilidade de coincidência aleatória não foram fornecidos.

Outro estudo realizado no Sudeste do Brasil com 290 indivíduos, no qual foram analisadas as três regiões hipervariáveis do DNA mitocondrial, apresentou um valor de H de 0.9966 ± 0.0010 e uma probabilidade de coincidência aleatória de

0.0068. Quanto à ancestralidade, foram observados 107 haplótipos ameríndios, 102 africanos, 80 europeus e 01 asiático (FRIDMAN *et al.*, 2014).

Em Santa Catarina, foi realizado um estudo com oitenta indivíduos residentes neste Estado, analisando toda região controle do DNA mitocondrial. Entre os resultados foram observadas uma diversidade de sequência de 0.9930 ± 0.0035 e uma probabilidade de coincidência aleatória de 0.0194, bem como uma predominância de 63.8% do DNA mitocondrial com ancestralidade européia (PALENCIA *et al.*, 2010).

No Espírito Santo também foi realizado um estudo semelhante, analisando toda região controle do DNA mitocondrial em 97 indivíduos. Foi observada uma diversidade de sequência de 0.9994 ± 0.0016 e uma probabilidade de coincidência aleatória de 0.0109. Quanto à ancestralidade, foram observados 43.3% de matrilineagens africanas, 32.0% européias, 23.7% ameríndias e 1.0% asiática (SANCHES *et al.*, 2014).

Assim, observa-se que ainda existem poucos estudos sobre a diversidade do DNA mitocondrial no Brasil se considerarmos suas proporções geográficas e a miscigenação de sua população. Além disso, poucos são os estudos publicados que analisaram toda a região controle do DNA mitocondrial, conforme preconiza-se atualmente em estudos genéticos populacionais para uso forense (PARSON *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS GERAIS

Verificar a diversidade de haplótipos de DNA mitocondrial em uma amostra da população do Estado do Paraná.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os diferentes haplótipos obtidos da região controle de DNA mitocondrial e estimar as frequências haplotípicas;
- Estabelecer os haplogrupos predominantes nesta amostra populacional;
- Determinar o poder de discriminação, para a prática forense, da região controle do DNA mitocondrial nesta amostra da população paranaense.

3 JUSTIFICATIVA

A Ciência Forense tem mostrado grande interesse na utilização do DNA mitocondrial para resolução de casos de identificação humana e exames de verossimilhança entre amostras de referência (material genético coletado de suspeitos) e fluidos corpóreos encontrados em cenas de crime. Isto, pois, em aproximadamente 30% dos casos, o DNA nuclear encontra-se muito degradado, impossibilitando as análises tradicionais por STRs (*“short tandem repeats”*). Este trabalho permitirá verificar a variabilidade da região controle do DNA mitocondrial em uma amostra da população do estado do Paraná e estabelecer os haplogrupos predominantes, bem como estimar o poder de discriminação na prática forense deste marcador molecular na população paranaense. Além disso, a posterior implantação desta técnica de sequenciamento na rotina do Instituto de Criminalística do Estado do Paraná auxiliará a justiça na elucidação de crimes.

4 ARTIGO

As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão serão apresentadas na forma de artigo científico, o qual foi submetido à revista *Internacional Journal of Legal Medicine*.

Mitochondrial DNA control region diversity in a population from Parana State - increasing the Brazilian forensic database

M.M.Poletto^{a, b}, M. Malaghini^b, J. S. Silva^a, K. Braun-Prado^c, M.G. Bicalho^a

^a Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

^b Laboratório de Genética Molecular Forense, Polícia Científica do Paraná, Curitiba, Brazil.

^c Laboratório de Genética Molecular Humana, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

Abstract

The entire mitochondrial DNA (mtDNA) control region (nucleotide position 16024-576) sequences were obtained through Sanger sequencing method for 122 individuals from Parana state, South of Brazil. We observed a total of 108 different haplotypes of which 97 were unique and 11 were shared by more than one individual. The haplogroups were classified according to the updated mtDNA phylogeny, by EMMA (Estimating Mitochondrial Haplogroups Using a Maximum Likelihood Approach). Our results revealed the predominance of Amerindian haplogroups with a frequency of 49.2% of the population sample, followed by European lineages with 38.5% and 12.3% of African lineages. Parana population sample set presented a high haplotype diversity (0.9976) and the random match probability was 0.0106. The phylogenetical findings and the diversity indices confirm the high genetic heterogeneity of this population and suggest a high informativeness of mtDNA analyses in forensic cases. The population data will contribute to increase the Brazilian mtDNA database for forensic purposes and it is available through EMPOP (European DNA Profiling Group mitochondrial DNA population database) under the accession number: EMP00714.

Keywords

Mitochondrial DNA, Control region, Genetic population data, forensic application, Parana, Brazil

Introduction

Mitochondrial DNA (mtDNA) genome analysis has been a potent tool in forensic practice as result of its properties and certain advantages over nuclear DNA in some legal cases [1]. The increase of the mitochondrial population data, in the last fifteen years, provided a better understanding of the mitochondrial phylogeny and it also

motivated the publication of new forensic guidelines to ensure data quality and to establish standardization between laboratories around the world [2, 3].

For many years, the genetic diversity of the mtDNA sequence in different ethnic populations has been revealed through Sanger sequencing of the hypervariable 1 and 2 regions (HV1 and HV2) (from positions 16024-16365 and from 73-340, respectively) [4-7]. In the late 1990s, a third hypervariable region (HV3) (from positions 438-576) was also included in some population studies [8-11]. Nowadays, it is recommended sequencing of the entire mitochondrial DNA control region (from positions 16024-576) in population database studies, to increase the power of discrimination and the haplogroup determination [3,12].

In Brazil, previous studies based on the analysis of the HVs regions had been published [13-15]. Brazil is in South America and it has one of the most heterogeneous populations in the world, which is the result of five centuries of interethnic crosses of peoples from three continents: European colonizers, mainly represented by Portuguese, enslaved Africans and native Amerindians [16]. The mtDNA haplogroups frequencies are variable between Brazilian regions [17], as result of its large geographical extension and its highly mixed population [18]. Parana State is in the southern of Brazil, represents 2.34% of Brazilian territorial extension [19], and according to regional history data, the Parana population is also three-hybrid, with the contribution of Amerindians, Africans and Europeans [20]. This is the first study to report the mitochondrial DNA diversity of Parana State. Therefore, the aim of this work is to generate high quality mtDNA forensic data to increase Brazilian mitochondrial genetic information, as well as to establish the predominant mtDNA haplogroups in the Parana state population sample set.

Materials and methods

DNA samples

Genomic DNA, extracted from peripheral blood by Biopur Kit Extration Mini Spin Plus (Mobius Life Science, Brazil) according to the manufacturer's instructions, was obtained from 94 Euro-Brazilians, 24 Brazilians of mixed ancestry and 4 Afro-Brazilians healthy unrelated individuals. They were assigned to one of these three groups based on self-classification and the sample size selected for each ethnic group was guided to respect the proportional contribution of them for Parana population according to the last data published [19]. Informed consent was obtained from all participants. This study was performed according to Brazilian Federal laws and it was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Parana.

PCR Amplification

The entire mtDNA control region was amplified in a single amplicon (1418 bp), as recommended in [3], using the primer sets L15879 (5' AAT GGG CCT GTC CTT GTA GT 3') and H727 (5' AGG GTG AAC TCA CTG GAA CG 3') [13]. Amplification reactions were done with AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), following manufacturer's specifications, using 50ng of genomic DNA, in a final volume of 50ul. The reactions were performed under conditions of initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing at 58°C for 30 seconds, extension at 72°C for 1 min and 40 seconds.

Sequencing

PCR products were purified using 10U Exonuclease I (EXO I) (United States Biochemical - USB, Staufen, Germany) and 2U Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) and 10X SAP Buffer (United States Biochemical - USB, Staufen, Germany). The sequencing reactions were made using BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1, according to manufacturer's protocol. To ensure high quality data and double coverage at all positions, sequencing reaction was performed in both, forward and reverse, strands. The ten sequencing primers used are listed in Table 1. In cases of length heteroplasmy, the double coverage of some positions was obtained from the same strand which was sequenced at least twice with different primers, as recommended in [3]. The sequenced fragments were analyzed by ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA).

Table 1: Sequencing Primers

Primers	Sequence (5' - 3')	References
L15879	AAT GGG CCT GTC CTT GTA GT	[13]
L15971	TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC	[2]
L16413	TGA AAT CAA TAT CCC GCA CA	[13]
H16548	GGG AAC GTG TGG GCT ATT TA	[13]
L00015	CAC CCT ATT AAC CAC TCA CG	[2]
H00159	AAA TAA TAG GAT GAG GCA GGA ATC	[2]
L00314	CCG CTT CTG GCC ACA GCA CT	[2]
H00484	TGA GAT TAG TAG TAT GGG AG	[2]
H00649	TTT GTT TAT GGG GTG ATG TGA	[21]
H00727	AGG GTG AAC TCA CTG GAA CG	[13]

Data analyses

The mtDNA control region was aligned and compared with the revised Cambridge Reference Sequence [22,23] using SeqScape Software v2.7 (Life Technologies, Foster City, CA, USA). To ensure high quality data, two independent evaluations of raw data were performed. The length heteroplasmy in homopolymeric sequence stretches was interpreted by reporting the dominant variant [3,24]. Haplogroup affiliation was inferred according to Phylotree, build 17 [25], by EMMA software (Estimating mitochondrial haplogroups using a maximum likelihood approach) provided by EMPOP ver.3 (<http://www.empop.org>) [26,27]. The ARLEQUIN v3.5 software was used to calculate molecular diversity indices, such as number of different haplotypes, number of polymorphic sites, sequence diversity, nucleotide diversity and mean number of pairwise differences [28]. The random match probability was calculated as the sum of squared haplotype frequencies based on mtDNA control region sequences. For the statistical analysis, the C-stretch length

variation at positions 16193, 309 and 573 were excluded, with a total of 1131 usable sites.

Results and Discussion

All haplotypes and haplogroups obtained from Parana samples are listed in table SM1. For the 122 individuals analyzed, 108 haplotypes were identified. Of them, 97 sequences were unique, 9 were observed twice, 1 was observed three times and 1 was observed four times. The most frequent haplotype (16519C, 263G, 315.1C) was observed in 3.3% of the population sample.

In the 1131 analyzed positions, it was observed 191 polymorphic sites (16.9%) distributed in 161 positions with only transition, 7 sites with only transversion, 6 positions with transition and transversion and 17 with indels. A previous study with higher sample size showed 6% of point heteroplasmy frequency [29]. In our data, we observed similar frequency (5.7%) of point heteroplasmy founded in seven samples, which presented five Y and two R transitions as followed: 16192Y, 16311Y, 16355Y, 185R, 271Y, 310Y and 374R. All of them were reported before in [29], except the last one (374R).

The molecular diversity indices calculated for the entire control region and for HV1, HV2 and HV3 in Parana population sample are available in table 2. The results reinforce the greater informativeness of the HV1 region when compared to the other two hypervariable regions and show the increased power of discrimination when the entire control region is analyzed.

The sequence diversity calculated for the entire control region was 0.9976 ± 0.0016 and the random match probability estimated between two unrelated individuals in Parana state population was 0.0106. High values from sequence diversity were also reported in other Brazilian population studies [13-15,30-32], confirming the population heterogeneity in this country.

Table 2: Genetic diversity in 122 samples from Parana state population, Brazil.

Molecular diversity indices	HV1	HV2	HV3	HV1+2	HV1+2+3	Control region
Number of haplotypes	95	52	27	103	105	108
Number of polymorphic sites	96	51	23	147	170	191
Sequence diversity	0.9917 ± 0.0035	0.9453 ± 0.0117	0.8592 ± 0.0180	0.9958 ± 0.0021	0.9966 ± 0.0018	0.9976 ± 0.0016
Random match probability	0.0164	0.0624	0.1478	0.0124	0.0116	0.0106
Mean number of pairwise differences	7.6602 ± 3.5961	4.5768 ± 2.2639	2.4820 ± 1.3496	12.2370 ± 5.5660	14.7190 ± 6.6330	16.1710 ± 7.2570
Nucleotide diversity	0.0223 ± 0.0116	0.0170 ± 0.0093	0.0174 ± 0.0105	0.0200 ± 0.0101	0.0195 ± 0.0097	0.0143 ± 0.0071

mtDNA haplogroups composition

The haplogroups identified in the examined sample showed the coexistence of matrilineal lineages with different phylogeographic origins. The importance of the indigenous women into the formation of Parana population was revealed by the prevalence of 49.2% of Amerindian mitochondrial lineages. It was observed the coexistence of haplogroups B and C (15.6% each) with the highest frequencies, followed by A (13.9%) and D (4.1%), as showed in Table 3. The haplogroups A, C and D were identified in Guarani tribes, and the haplogroups A, B and C in Kaingang tribes, the two major Native Amerindian groups who lived in Parana state [33]. The high frequency of Amerindian matrilineal lineages in Parana State population reinforces the suggestion of a directional mating involving European males and Amerindian females in Brazil, as it was reported in [34] and also in agreement with historical data. In the XVI century, the mating between European men and indigenous women was encouraged as a strategy for population growth and colonial occupation of the country [35].

Regarding the European component, represented by 38.5% of the haplotypes in our study (haplogroups H, U3, U5, R0, T, K, J, V, W and X2), as shown in table 3, the prevalence of haplogroup H agrees with previous descriptions of European lineages in Brazil [31]. The haplogroup H was the most representative (11.5%), as occurs in most European populations [36]. The haplogroup U (except U6) was the second most frequent European haplogroup (7.4%) in the sample set, followed by haplogroup R0 with 6.5%. All these three haplogroups are also the most frequent haplogroups found in Portugal population [37], which agrees with the Brazilian colonization history. In the second half of the nineteenth century, many immigrants from Europe settled in Parana such as Italians, Germans, Ukrainians, and some English, French, and Swiss people [20]. Accordingly with this populational diversity we also observed different European haplogroups (T, K, J, V, W and X2) with small frequencies (table 3).

Considering the 12.3% of African lineages (L2, L1, L3, L0 and U6), the African sub-Saharan haplogroups (L2, L1, L3 and L0) were the most frequent (10.7%) in this study (table 3). The subhaplogroup L3e is known to have high frequencies in West-Central Africa, which was the main source of Africans brought to Brazil during the colonial period [38]. But with the abolition of slavery (1888), the proportion of Africans in the population of the State of Parana has decreased substantially [13]. The North African contribution in this sample set, represented by the haplogroup U6 (1.6%), showed components of Maghreb origin, which has a high frequency in Portuguese, the main Europeans colonizers of Brazil [39].

Table 3: Frequencies of the mtDNA haplogroups and subhaplogroups in Parana sample set

Haplogroup	Subhaplogroup	Number of samples	%
A		17	13.9
	A	1	0.8
	A2	13	10.7
	A2a	1	0.8
	A2i	1	0.8
	A2l	1	0.8
B		19	15.6
	B2	3	2.5
	B2b	2	1.6
	B2h	3	2.5
	B4b	11	9.0
C		19	15.6
	C1a	1	0.8
	C1b	15	12.4
	C1c	2	1.6
	C1d	1	0.8
D		5	4.1
	D1e	4	3.3
	D1f	1	0.8
H		14	11.5
	H	5	4.1
	H1a	1	0.8
	H1b	1	0.8
	H1c	1	0.8
	H1q	1	0.8
	H2a	1	0.8
	H2c	1	0.8
	H5a	1	0.8
	H10	1	0.8
	H15	1	0.8
R	R0	8	6.5
U		11	9.0
	U3	1	0.8
	U5a	7	5.8
	U5b	1	0.8
	U6a	2	1.6

K	K1a	4	3.3
T		4	3.3
	T1a	2	1.6
	T2b	1	0.8
	T2e	1	0.8
J		3	2.5
	J1	1	0.8
	J1c	1	0.8
	J2	1	0.8
V	V18	2	1.6
W	W6	2	1.6
X	X2b	1	0.8
L		13	10.7
	L0a	2	1.6
	L1c	3	2.5
	L2a	2	1.6
	L2b	1	0.8
	L2c	2	1.6
	L3d	1	0.8
	L3e	2	1.6

Comparisons between different states and regions of Brazil, emphasize the differences between haplogroups composition in each Brazilian region [13-15,30-32]. However, the precise haplogroup assignment for some haplotypes is difficult even with entire control region analyzed. In this situation, the analysis of mtDNA coding region SNPs is recommended to refine the haplogroup classification, as it was done for H European haplogroup subdivided into many lineages [40,41], and in some Native American clades, such as B2, which is incompletely classified by control region motifs [42,43]. The analysis of SNPs in the coding region is also a tool to increase the discrimination power of common haplotypes in forensic cases [44].

Finally, the high sequence diversity and the relatively low random match probability calculated from Parana state population sample set, imply in a high probability of differentiating between two given maternal lineages and reinforce the mtDNA analyses informativeness in forensic cases. The haplotypes reported in the present study are available for forensic purposes via EMPOP (www.empop.org), under the accession number: EMP00714.

Acknowledgements The authors would like to acknowledge the Federal University of Parana, Laboratory of Immunogenetics and Histocompatibility and Scientific Policy of Parana. This work was supported by the Foundation of Federal University of Parana (FUNPAR).

International Journal of Legal Medicine

MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION DIVERSITY IN A POPULATION FROM PARANA STATE- INCREASING THE BRAZILIAN FORENSIC DATABASE.

^{1,2}Mariane Moreira Poletto*, ²Marcelo Malaghini, ¹José Samuel da Silva, ³Karin Braun-Prado, ¹Maria da Graça Bicalho.

¹Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

²Laboratório de Genética Molecular Forense, Polícia Científica do Paraná, Curitiba, Brazil.

³Laboratório de Genética Molecular Humana, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

References

[1] Carracedo A, Bär W, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider P, Budowle B, Brinkmann B, Gill P, Holland M, Tully G, Wilson M (2000) DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int* 110:79–85.

[2] Parson W, Bandelt HJ (2007) Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* 1:13–19.

[3] Parson W, Gusmao L, Hares DR, Irwin JA, Mayr WR, Morling N, Pokorak E, Prinz M, Salas A, Schneider PM, Parsons TJ (2014) DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int Genet* 13:134-142.

[4] Budowle B, Wilson MR, Dizinno JA, Stauffer C, Fasano MA, Holland MM, Monson KL (1999) Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. *Forensic Sci Int* 103:23–35.

[5] Imaizumi K, Parsons TJ, Yoshino M, Holland MM (2002) A new database of mitochondrial DNA hypervariable regions I and II sequences from 162 Japanese individuals. *Int J Legal Med* 116:68–73.

[6] Budowle B, Allard MW, Fisher CL, Isenberg AR, Monson KL, Stewart JE, Wilson MR, Miller KW (2002) HVI and HVII mitochondrial DNA data in Apaches and Navajos. *Int J Legal Med* 116:212–215.

[7] Tetzlaff S, Brandstätter A, Wegener R, Parson W, Weirich V (2007) Mitochondrial DNA population data of HVS-I and HVS-II sequences from a northeast German sample. *Forensic Sci Int* 172:218–224.

[8] Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S (1997) A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. *Hum Genet* 101:384.

[9] Lutz S, Wittig H, Weisser HJ, Heizmann J, Junge A, Dimo-Simonin N, Parson W, Edelmann J, Anslinger K, Jung S, Augustin C (2000) Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Sci Int* 113:97-101.

[10] Bini C, Ceccardi S, Luiselli D, Ferri G, Pelotti S, Colalongo C, Falconi M, Pappalardo G (2003) Different informativeness of the three hypervariable mitochondrial DNA regions in the population of Bologna (Italy). *Forensic Sci Int* 135:48–52.

- [11] Zhang YJ, Xu QS, Zheng ZJ, Lin HY, Lee JB (2005) Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region I, II and III in northeast China Han. *Forensic Sci Int* 149:267–269.
- [12] Carracedo A, Butler JM, Gusmão L, Parson W, Roewer L, Schneider PM (2010) Publication of population data for forensic purposes. *Forensic Sci Int Genet* 4:145–147.
- [13] Fridman C, Gonzalez RS, Pereira AC, Cardena MM (2014) Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region in a population of southeastern Brazil. *Int J Legal Med* 128:589–593.
- [14] Ribeiro-dos-Santos AK, Carvalho BM, Feio-dos-Santos AC, dos Santos SE (2007) Nucleotide variability of HV-I in Afro-descendents populations of the Brazilian Amazon Region. *Forensic Sci Int* 167:77–80.
- [15] Bernardo S, Hermida R, Desidério M, Silva DA, de Carvalho EF (2014) MtDNA ancestry of Rio de Janeiro population, Brazil. *Mol Biol Rep* 41:1945–1950.
- [16] Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:177-182.
- [17] Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF (2000) The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67:444–461.
- [18] Salzano FM, Freire-Maia N (1967) *Populações Brasileiras, Aspectos Demográficos, Genéticos e Antropológicos*. Companhia Editora Nacional, São Paulo.
- [19] IBGE, Censo demográfico (2010) Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. www.ibge.gov.br. Accessed 25 May 2017.
- [20] Wachowicz RC (1995) *História do Paraná*. Gráfica Vicentina, Curitiba.
- [21] Brandstätter A, Peterson CT, Irwin JA, Mpoke S, Koech DK, Parson W, Parsons TJ (2004) Mitochondrial DNA control region sequences from Nairobi (Kenya): inferring phylogenetic parameters for the establishment of a forensic database. *Int J Legal Med* 118:294-306.
- [22] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- [23] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge Reference Sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 23:147.

- [24] Berger C, Hatzer-Grubwieser P, Hohoff C, Parson W (2011) Evaluating sequence derived mtDNA length heteroplasmy by amplicon size analysis. *Forensic Sci Int Genet* 5:142–145.
- [25] van Oven M, Kayser M (2009) Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30:E386–E394.
- [26] Röck AW, Dür A, van Oven M, Parson W. (2013) Concept for estimating mitochondrial DNA haplogroups using a maximum likelihood approach (EMMA). *Forensic Sci Int Genet* 7:601–609.
- [27] Parson W, Dür A. EMPOP – a forensic mtDNA database (2007) *Forensic Sci Int Genet* 1:88–92.
- [28] Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564–567.
- [29] Irwin JA, Saunier JL, Niederstätter H, Strouss KM, Sturk KA, Diegoli TM, Brandstätter A, Parson W, Parsons TJ (2009) Investigation of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from more than 5000 global population samples. *J Mol Evol* 68:516–527.
- [30] Barbosa AB, da Silva LA, Azevedo DA, Balbino VQ, Mauricio-da-Silva L (2008) Mitochondrial DNA control region polymorphism in the population of Alagoas State, North-Eastern Brazil. *J Forensic Sci* 53:142-146.
- [31] Palencia L, Valverde L, Alvarez A, Cainé LM, Cardoso S, Alfonso-Sánchez MA, Pinheiro MF, de Pancorbo MM (2010) Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil): predominance of the European input. *Int J Legal Med* 124:331-336.
- [32] Sanches NM, Paneto GG, Figueiredo RF, de Mello AO, Cicarelli RM (2014) Mitochondrial DNA control region diversity in a population from Espírito Santo state, Brazil. *Mol Biol Rep* 41:6645-6648.
- [33] Marrero AR, Silva-Junior WA, Bravi CM, Hutz MH, Petzl-Erler ML, Ruiz-Linares A, Salzano FM, Bortolini MC (2007) Demographic and Evolutionary Trajectories of the Guarani and Kaingang Natives of Brazil. *American Journal of Physical Anthropology* 132:301-310.
- [34] Pena SD, Carvalho-Silva DR, Alves-Silva J, Prado VF, Santos FR (2000) Retrato Molecular do Brasil. *Ciência hoje* 27:16-25.
- [35] MÖRNER, M (1967) Race mixture in the history of Latin America. Little Brown & Company, Boston.

- [36] Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R, Cruciani F, Zeviani M, Briem E, Carelli V, Moral P, Dugoujon JM, Roostalu U, Loogväli EL, Kivisild T, Bandelt HJ, Richards M, Villems R, Santachiara-Benerecetti AS, Semino O, Torroni A (2004) The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am J Hum Genet* 75:910–918.
- [37] Marques SL, Goios A, Rocha AM, Prata MJ, Amorim A, Gusmão L, Alves C, Alvarez L (2015) Portuguese mitochondrial DNA genetic diversity - An update and a phylogenetic revision. *Forensic Sci Int Genet* 15:27-32.
-
- [38] Bandelt HJ, Alves-Silva J, Guimaraes PE, Santos MS, Brehm A, Pereira L, Coppa A, Larruga JM, Rengo C, Scozzari R, Torroni A, Prata MJ, Amorim A, Prado VF, Pena SD (2001) Phylogeography of the human mitochondrial haplogroup L3e: a snapshot of African prehistory and Atlantic slave trade. *Ann Hum Genet* 65:549-563.
- [39] Secher B, Fregel R, Larruga JM, Cabrera VM, Endicott P, Pestano JJ, González AM (2014) The history of the North African mitochondrial DNA haplogroup U6 gene flow into the African, Eurasian and American continents. *BMC Evolutionary Biology* 14:109. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-109>
- [40] Grignani P, Peloso G, Achilli A, Turchi C, Tagliabracci A, Alù M, Beduschi G, Ricci U, Giunti L, Robino C, Gino S, Previderè C (2006) Subtyping mtDNA haplogroup H by SNaPshot minisequencing and its application in forensic individual identification. *Int J Leg Med* 120:151–156.
- [41] Köhnemann S, Sibbing U, Pfeiffer H, Hohoff C (2008) A rapid mtDNA assay of 22 SNPs in one multiplex reaction increases the power of forensic testing in European Caucasians. *Int J Legal Med* 122:517–523.
- [42] Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Woodward SR, Salas A, Torroni A, Bandelt HJ (2008) The phylogeny of the four Pan-American MtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS One* 3:e1764.
- [43] Bobillo MC, Zimmermann B, Sala A, Huber G, Röck A, Bandelt HJ, Corach D, Parson W (2010) Amerindian mitochondrial DNA haplogroups predominate in the population of Argentina: towards a first nationwide forensic mitochondrial DNA sequence database. *Int J Legal Med* 124:263–268.
- [44] Goncalves FT, Cardena MMSG, Gonzalez RS, Krieger JE, Pereira AC, Fridman C (2011) The discrimination power of the hypervariable regions HV1, HV2 and HV3 of mitochondrial DNA in the Brazilian population. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 3:e311-e312.

Table SM1: Haplotypes obtained from Parana sample (n = 122) and their haplogroup estimation

Sample	Haplogroup estimated	Haplotype (16024-576)
BRPR001	A-152-16362	16223T 16290T 16319A 16362C 16527T 73G 146C 151T 235G 263G 271Y 309.1C 315.1C 523- 524-
BRPR002	A2	16097C 16098G 16111T 16189C 16223T 16290T 16319A 16320T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523- 524-
BRPR003	A2	16111T 16126C 16223T 16259T 16290T 16319A 16362C 16390A 16519C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523- 524-
BRPR004	A2	16111T 16223T 16269G 16290T 16319A 16360T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 485C 523- 524-
BRPR005	A2-64	16126C 16223T 16278T 16290T 16310A 16319A 16362C 16519C 59C 64T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 297G 309.1C 315.1C 523- 524- 573.1C 573.2C 573.3C
BRPR006	A2-64	16092C 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 16468C 16519C 64T 73G 146C 153G 185A 235G 263G 309.1C 315.1C 338T 523- 524- 573.1C
BRPR007	A2-64	16126C 16223T 16278T 16290T 16319A 16362C 59C 62T 64T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 297G 315.1C 523- 524- 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C 573.5C
BRPR008	A2-64	16126C 16223T 16278T 16290T 16319A 16362C 59C 64T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 297G 309.1C 315.1C 523- 524- 573.1C
BRPR009	A2-64	16129A 16183C 16189C 16193.1C 16223T 16290T 16311C 16319A 16362C 16456A 16519C 64T 73G 146C 152C 153G 188G 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523- 524-
BRPR010	A2-64	16111T 16223T 16266T 16290T 16319A 16325C 16362C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523- 524-
BRPR011	A2-64	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 16519C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523- 524-
BRPR012	A2-64	16111T 16223T 16266T 16290T 16319A 16325C 16362C 64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523- 524-
BRPR013	A2-64	16092C 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 16365T 16468C 16519C 64T 73G 146C 153G 185R 235G 263G 315.1C 338T 523- 524- 573.1C
BRPR014	A2-64	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 16519C 64T 73G 146C 153G 210G 235G 263G 309.1C 315.1C 523- 524-
BRPR015	A2ah	16097C 16098G 16111T 16142T 16189C 16193.1C 16193.2C 16223T 16290T 16319A 16320T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C 523- 524-
BRPR016	A2i	16111T 16223T 16290T 16292T 16319A 16362C 57G 59C 64T 73G 94A 146C 153G 159C 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523- 524-
BRPR017	A2l	16126C 16145A 16223T 16278T 16290T 16319A 16362C 59C 64T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 297G 309.1C 315.1C 523- 524-
BRPR018	B2	16183C 16189C 16193.1C 16217C 16519C 73G 146C 152C 263G 315.1C 499 ^a
BRPR019	B2	16182C 16183C 16189C 16193.1C 16217C 16240C 16241G 16519C 73G 103A 152C 263G 309- 315.1C 499 ^a
BRPR020	B2	16182C 16183C 16189C 16217C 16241G 16519C 73G 103A 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499 ^a
BRPR021	B2b3a	16182C 16183C 16189C 16193.1C 16217C 16249C 16312G 16344T 16519C 73G 152C 263G 271T 309.1C 309.2C 315.1C 499A
BRPR022	B2b3a	16182C 16183C 16189C 16193.1C 16217C 16249C 16312G 16344T 16357C 16519C 73G 152C 263G 271T 309.1C 309.2C 315.1C 460C 464- 465- 499A
BRPR023	B2h	16092C 16183C 16189C 16193.1C 16217C 16468C 16519C 73G 152C 263G 309.1C 315.1C 460C 463.1C 499A 523- 524-
BRPR024	B2h	16092C 16183C 16189C 16193.1C 16217C 16468C 16519C 73G 152C 263G 309.1C 315.1C 455.1T 460C 499A

BRPR025	B2h	16183C 16189C 16193.1C 16217C 16466G 16468C 16519C 73G 152C 263G 309.1C 315.1C 455.1T 460C 499A
BRPR026	B4b	16126C 16183C 16189C 16193.1C 16217C 16372C 16519C 73G 263G 315.1C 374R 499A
BRPR027	B4b	16178C 16183C 16189C 16193.1C 16193.2C 16217C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 499A
BRPR028	B4b	16178C 16183C 16189C 16193.1C 16193.2C 16217C 16519C 73G 263G 315.1C 499A
BRPR029	B4b	16182C 16183C 16189C 16193.1C 16217C 16482G 16519C 73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A 524.1A 524.2C
BRPR030	B4b	16126C 16183C 16189C 16193.1C 16217C 16372C 16519C 73G 263G 315.1C 499A
BRPR031	B4b	16178C 16183C 16189C 16193.1C 16193.2C 16217C 16298C 16519C 73G 263G 315.1C 499A
BRPR032	B4b	16178C 16183C 16189C 16193.1C 16193.2C 16217C 16519C 73G 263G 315.1C 499A
BRPR033	B4b	16126C 16183C 16189C 16193.1C 16217C 16372C 16519C 73G 263G 315.1C 499A
BRPR034	B4b	16182C 16183C 16186T 16189C 16217C 16311C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 499A
BRPR035	B4b	16183C 16189C 16193.1C 16217C 16271C 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 499A 573.1C 573.2C
BRPR036	B4b	16145A 16183C 16189C 16193.1C 16217C 16316G 16319A 16519C 57G 73G 195C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 499A 523- 524-
BRPR037	C1a	16166G 16223T 16224C 16260T 16298C 16325C 16327T 16356C 16519C 73G 193G 249- 263G 290- 291- 315.1C 489C
BRPR038	C1b	16223T 16248T 16298C 16325C 16327T 56T 57C 73G 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR039	C1b	16187T 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR040	C1b	16189C 16190T 16193.1C 16223T 16248A 16298C 16325C 16327T 16360T 73G 152C 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR041	C1b	16189C 16190T 16193.1C 16223T 16248A 16298C 16325C 16327T 16360T 73G 152C 249- 263G 290- 291- 309.1C 310Y 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR042	C1b	16166G 16193T 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 150T 249- 263G 290- 291- 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR043	C1b	16172C 16223T 16298C 16325C 16327T 16526A 73G 153G 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR044	C1b	16037G 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 152C 249- 263G 290- 291- 309.1C 309.2C 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR045	C1b	16223T 16298C 16325C 16327T 16344T 16526A 73G 152C 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR046	C1b	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR047	C1b	16163G 16209C 16223T 16234T 16298C 16325C 16327T 73G 188G 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C 493G
BRPR048	C1b	16037G 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 152C 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR049	C1b2	16223T 16298C 16325C 16327T 16519C 73G 249- 290- 291- 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR050	C1b2	16223T 16298C 16325C 16327T 16519C 73G 225A 249- 290- 291- 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR051	C1b2	16223T 16298C 16325C 16327T 16519C 73G 225A 249- 290- 291- 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR052	C1b8a	16223T 16298C 16325C 16327T 16362C 73G 150T 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C 493G 523- 524-
BRPR053	C1c+195	16176T 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 195C 203A 204C 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C

BRPR054	C1c-195	16176T 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 195C 203A 204C 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C
BRPR055	C1d	16051G 16223T 16298C 16320T 16325C 16327T 16344T 9A 73G 152C 249- 263G 290- 291- 309.1C 315.1C 489C 523- 524-
BRPR056	D1e	16189C 16223T 16325C 16362C 16519C 73G 146C 195C 207A 263G 315.1C 489C
BRPR057	D1e	16051G 16183C 16189C 16193.1C 16223T 16325C 16362C 73G 146C 204C 207A 263G 315.1C 489C
BRPR058	D1e	16183C 16189C 16193.1C 16223T 16325C 16362C 73G 146C 204C 207A 263G 315.1C 489C
BRPR059	D1e	16183C 16189C 16193.1C 16223T 16325C 16362C 73G 146C 204C 207A 263G 315.1C 489C
BRPR060	D1f1	16142T 16179T 16223T 16295T 16325C 16362C 16497G 16519C 73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 489C 524.1A 524.2C
BRPR061	H	16129A 16242T 16519C 263G 309.1C 315.1C
BRPR062	H	16519C 93G 263G 309.1C 309.2C 315.1C
BRPR063	H	16519C 93G 263G 309.1C 315.1C
BRPR064	H	16111T 16519C 263G 309.1C 315.1C 573.1C
BRPR065	H	16092C 16256T 16519C 263G 315.1C 466C
BRPR066	H10a1b	16114T 16344T 16519C 263G 309.1C 315.1C 513A 523- 524-
BRPR067	H15	55C 57C 263G 309.1C 315.1C
BRPR068	H1a3	16051G 16162G 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C
BRPR069	H1b	16183C 16189C 16193.1C 16311C 16356C 16519C 152C 263G 315.1C 513A
BRPR070	H1c	16519C 263G 309.1C 315.1C 477C
BRPR071	H1q	16188G 16519C 16527T 263G 315.1C
BRPR072	H2a1e	16354T 263G 310C 575T
BRPR073	H2c1	16249C 16311C 194T 205A 263G 309.1C 309.2C 315.1C 523- 524-
BRPR074	H5a3a1	16212G 16304C 16519C 93G 263G 315.1C 456T 513A
BRPR075	J1-16193	16069T 16126C 16193T 16519C 73G 152C 263G 295T 315.1C 462T 489C
BRPR076	J1c-16261	16069T 16126C 16261T 73G 185A 228A 263G 295T 315.1C 462T 489C
BRPR077	J2a1a1a	16069T 16126C 16145A 16231C 16261T 73G 150T 152C 195C 215G 263G 295T 310.1T 315.1C 319C 489C 513A
BRPR078	K1a	16093C 16224C 16311C 16519C 73G 263G 315.1C 497T 524.1A 524.2C 524.3A 524.4C
BRPR079	K1a	16224C 16311C 16519C 73G 195C 263G 315.1C 497T
BRPR080	K1a	16224C 16311C 16519C 73G 263G 315.1C 497T
BRPR081	K1a1b2a1	16093C 16213A 16224C 16311C 16519C 73G 114T 152C 263G 309.1C 315.1C 497T
BRPR082	R0	16519C 263G 315.1C
BRPR083	R0	16519C 263G 309.1C 315.1C
BRPR084	R0	16300G 16519C 263G 309.1C 315.1C
BRPR085	R0	16355Y 16519C 263G 315.1C
BRPR086	R0	16519C 152C 263G 309.1C 315.1C 573.1C 573.2C 573.3C 573.4C
BRPR087	R0	16519C 263G 315.1C
BRPR088	R0	16167T 16519C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
BRPR089	R0	16519C 263G 309.1C 315.1C 573.1C 573.2C 573.3C
BRPR090	T1a	16126C 16163G 16186T 16189C 16284G 16294T 16519C 73G 263G 309.1C 315.1C 524.1A 524.2C
BRPR091	T1a1'3	16126C 16163G 16186T 16189C 16294T 16519C 73G 152C 195C 263G 309.1C 315.1C
BRPR092	T2b	16126C 16294T 16296T 16304C 16519C 73G 263G 315.1C

BRPR093	T2e	16093C 16126C 16153A 16264T 16294T 16519C 73G 150T 263G 315.1C 523- 524-
BRPR094	U3	16343G 73G 150T 263G 309.1C 315.1C
BRPR095	U5a1	16256T 16270T 16399G 73G 263G 309.1C 315.1C 573.1C
BRPR096	U5a1a1-152	16256T 16270T 16399G 73G 152C 263G 309.1C 315.1C 513A
BRPR097	U5a1a2	16256T 16270T 16399G 73G 263G 309.1C 315.1C 573.1C 573.2C
BRPR098	U5a1b1	16093C 16192T 16256T 16270T 16291T 16399G 73G 263G 309.1C 315.1C
BRPR099	U5a1b1	16192T 16256T 16270T 16291T 16311Y 16399G 73G 263G 315.1C
BRPR100	U5a1c2a	16192T 16256T 16270T 16286T 16320T 16399G 73G 183G 263G 309.1C 315.1C 524.1A 524.2C 524.3A 524.4C
BRPR101	U5a2a	16114A 16192T 16256T 16270T 16294T 16526A 73G 195C 263G 309.1C 315.1C
BRPR102	U5b1i	16167T 16192T 16270T 16311C 16318G 16356C 73G 150T 263G 315.1C
BRPR103	U6a	16172C 16183C 16189C 16193.1C 16219G 16278T 73G 263G 315.1C
BRPR104	U6a3e	16172C 16183C 16189C 16193.1C 16219G 16278T 16293G 16362C 16399G 73G 185A 186T 263G 315.1C 523- 524-
BRPR105	V18	16298C 72C 263G 309.1C 315.1C 508G
BRPR106	V18	16189C 16298C 16311C 72C 263G 309.1C 315.1C 508G
BRPR107	W6	16167T 16223T 16292T 16325C 16519C 73G 189G 194T 195C 204C 207A 263G 309.1C 315.1C 524.1A 524.2C
BRPR108	W6	16079T 16192T 16223T 16292T 16325C 16519C 73G 189G 194T 195C 204C 207A 263G 309.1C 315.1C
BRPR109	X2b-226	16189C 16192T 16223T 16278T 16295T 16519C 73G 153G 195C 225A 226C 263G 309.1C 315.1C
BRPR110	L0a1b1a1	16129A 16148T 16168T 16187T 16188G 16189C 16223T 16230G 16278T 16311C 16320T 93G 95C 185A 189G 236C 247A 263G 315.1C 523- 524-
BRPR111	L0a2a2	16148T 16172C 16187T 16188G 16189C 16223T 16230G 16311C 16320T 16519C 64T 93G 152C 189G 204C 207A 236C 247A 263G 315.1C 523- 524-
BRPR112	L1c1'2'4'5'6	16129A 16187T 16189C 16223T 16274A 16278T 16287T 16294T 16311C 16360T 16519C 73G 93G 146C 151T 152C 182T 186A 189C 195C 236C 247A 263G 297G 315.1C 316A 523- 524-
BRPR113	L1c3b	16129A 16163G 16187T 16189C 16223T 16278T 16293G 16294T 16311C 16360T 16519C 73G 151T 152C 182T 186A 189C 247A 263G 309.1C 315.1C 316A 523- 524-
BRPR114	L1c3b1a	16129A 16163G 16187T 16189C 16209C 16223T 16271C 16278T 16293G 16294T 16311C 16360T 16519C 73G 151T 152C 182T 186A 189C 247A 263G 315.1C 316A 523- 524-
BRPR115	L2a1-16189- (16192)	16189C 16191.1C 16192Y 16223T 16278T 16294T 16309G 16390A 16519C 73G 146C 152C 195C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
BRPR116	L2a1l	16189C 16192T 16223T 16278T 16294T 16309G 16390A 16519C 73G 143A 146C 152C 195C 263G 309.1C 315.1C 534T
BRPR117	L2b1a	16114A 16129A 16213A 16223T 16278T 16355T 16362C 16390A 73G 150T 152C 182T 195C 198T 204A 263G 315.1C 418T 523- 524-
BRPR118	L2c	16223T 16261T 16278T 16390A 73G 146C 150T 152C 182T 195C 198T 263G 315.1C 325T 523- 524-
BRPR119	L2c2	16065A 16223T 16264T 16278T 16390A 73G 93G 146C 150T 152C 182T 195C 198T 263G 309.1C 315.1C 325T 523- 524-
BRPR120	L3d3a	16124C 16182C 16183C 16189C 16223T 16278T 16304C 16311C 73G 152C 263G 315.1C 523- 524-
BRPR121	L3e1d	16176T 16223T 16327T 16390A 73G 150T 152C 189G 200G 263G 315.1C
BRPR122	L3e2b1	16164G 16172C 16189C 16320T 16519C 73G 146C 150T 195C 263G 315.1C 523- 524-

5 CONCLUSÃO

Após o desenvolvimento deste estudo é possível concluir que:

- A população do estado do Paraná apresenta uma grande diversidade de haplótipos da região controle do DNA mitocondrial. Entre os 122 indivíduos analisados, foram encontrados 108 haplótipos diferentes. Deste total, 97 sequências foram observadas em apenas um indivíduo, 9 foram relatadas duas vezes, uma delas foi observada três vezes, seguida da mais comum, que apresentou uma frequência de 3.3%, sendo observada em quatro das 122 amostras.
- Os dados estatísticos obtidos a partir dos haplótipos de DNA mitocondrial mostraram uma alta diversidade de sequência (0.9976) e uma baixa probabilidade de coincidência aleatória (0.0106), evidenciando o alto poder de discriminação deste marcador molecular na população do Paraná para fins de identificação forense.
- Os achados filogeográficos baseados na composição de haplogrupos confirmam a alta heterogeneidade genética desta população, com o predomínio de haplótipos ameríndios (49.2%), seguido dos europeus (38.5%) e africanos (12.3%).
- As diferenças nas proporções dos haplogrupos, observadas entre as populações de diferentes estados brasileiros, reforçam a necessidade de mais estudos regionais, constituindo uma base de dados nacional única representativa do país.

Os haplótipos obtidos no presente estudo contribuirão para o aumento da base de dados de mtDNA brasileira e estão disponíveis para pesquisa e consulta no EMPOP (<http://www.empop.org>) através do número de acesso: EMP00714.

REFERÊNCIAS

ACHILLI, A.; RENGO, C.; BATTAGLIA, V.; PALA, M.; OLIVIERI, A.; FORNARINO, S.; MAGRI, C.; SCOZZARI, R.; BABUDRI, N.; SANTACHIARA-BENERECETTI, A. S. Saami and Berbers—an unexpected mitochondrial DNA link. **Am J Hum Genet**, v. 76, n. 5, p. 883-886, 2005.

ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, B. G.; DE BRUIJN, M. H.; COULSON, A. R.; DROUIN, J.; EPERON, I. C.; NIERLICH, D. P.; ROE, B. A.; SANGER, F.; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J.; STADEN, R.; YOUNG, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, p. 457-465, 1981.

ANDREWS, R. M.; KUBACKA, I.; CHINNERY, P. F.; LIGHTOWLERS, R. N.; TURNBULL, D. M.; HOWELL, N. Reanalysis and revision of the Cambridge Reference Sequence for human mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v. 23, p. 147, october 1999.

ALVES-SILVA, J.; SILVA, S. M.; GUIMARÃES, P. E.; FERREIRA, A. C.; BANDELT, H. J.; PENA, S. D.; PRADO, V. F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet**, v. 67, p. 444-461, 2000.

BANDELT, H. J.; ACHILLI, A.; KONG, Q. P.; SALAS, A.; LUTZ-BONENGEL, S.; SUN, C.; ZHANG, Y. P.; TORRONI, A.; YAO, Y. G. Low "penetrance" of phylogenetic knowledge in mitochondrial disease studies. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 333, n. 1, p. 122-130, 2005.

BANDELT, H. J.; KONG, Q. P.; RICHARDS, M.; MACAULAY, V. Estimation of mutation rates and coalescence times: some caveats. In: BANDELT, H. J.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M. editors. **Human Mitochondrial DNA and the Evolution of *Homo sapiens***. Berlin: Springer-Verlag, p 47-90, 2006.

BANDELT, H.-J.; LAHERMO, P.; RICHARDS, M.; MACAULAY, V. Detecting errors in mtDNA data by phylogenetic analysis. **Int J Legal Med**, v. 115, p. 64-69, 2001.

BANDELT, H.-J.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M. Median networks: speedy construction and greedy reduction, one simulation, and two case studies from human mtDNA. **Mol Phylogenet Evol**, v. 16, p. 8-28, 2000.

BANDELT, H.-J.; PARSON, W. Consistent treatment of length variants in the human mtDNA control region: a reappraisal. **Int J Legal Med**, v. 122, p. 11-21, 2008.

BANDELT, H.-J.; SALAS, A.; LUTZ-BONENGEL, S. Artificial recombination in forensic mtDNA population databases. **Int J Legal Med**, v. 118, p. 267-273, 2004.

BARBOSA, A. B. G.; DA SILVA, L. A. F.; AZEVEDO, D. A.; BALBINO, V. Q.; MAURICIO-DA-SILVA, L. Mitochondrial DNA control region polymorphism in the population of Alagoas State, North-Eastern Brazil. **Journal of Forensic Sciences**, v. 53, n. 1, p. 142-146, 2008.

BEHAR, D. M.; VILLEMS, R.; SOODYALL, H.; BLUE-SMITH, J.; PEREIRA, L.; METSPALU, E.; SCOZZARI, R.; MAKKAN, H.; TZUR, S.; COMAS, D. The dawn of human matrilineal diversity. **Am J Hum Genet**, v. 82, n. 5, p. 1130-1140, 2008.

BENDALL, K. E.; SYKES, B. C. Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region. **American Journal of Human Genetics**, v. 57, p. 248–256, 1995.

BENDALL, K. E.; MACAULAY, V. A.; BAKER, J. R.; SYKES, B. C. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. **American Journal of Human Genetics**, v. 59, p. 1276–1287, 1996.

BERNARDO, S.; HERMIDA, R.; DESIDÉRIO, M.; SILVA, D. A.; DE CARVALHO, E. F. MtDNA ancestry of Rio de Janeiro population, Brazil. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 1945–1950, 2014.

BETHELL, L. **Nota sobre as populações americanas às vésperas das invasões européias**. In: Bethel L (ed) América Latina colonial. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 129–131, 1997.

BRANDSTÄTTER, A.; PARSON, W. Mitochondrial DNA heteroplasmy or artefacts—a matter of the amplification strategy? **International Journal of Legal Medicine**, v. 117, p. 180–184, 2003.

BRANDSTÄTTER, A.; NIEDERSTÄTTER, H.; PARSON, W. Monitoring the inheritance of heteroplasmy by computer-assisted detection of mixed basecalls in the entire human mitochondrial DNA control region. **Int J Legal Med**, v. 118, p. 47–54, 2004.

BRANDSTÄTTER, A.; PETERSON, C. T.; IRWIN, J. A.; MPOKE, S.; KOECH, D. K.; PARSON, W.; PARSONS, T. J. Mitochondrial DNA control region sequences from Nairobi (Kenya): inferring phylogenetic parameters for the establishment of a forensic database. **Int J Legal Med**, v. 118, n. 5, p. 294-306, Oct 2004.

BRAUN-PRADO, K.; MION, A. L. V.; PEREIRA, N. F.; CULPI, L.; PETZL-ERLER, M. L. HLA class I polymorphism, as characterized by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v. 56, p. 417-427, Nov 2000.

BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **P.N.A.S.**, v. 76, p. 1967–1971, 1979.

BROWN, W. M.; PRAGER, E. M.; WANG, A.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA sequences in primates: tempo and mode of evolution. **J Mol Evol**, v. 18, p. 225–239, 1982.

BUDOWLE, B.; ALLARD, M. W.; WILSON, M. R.; CHAKRABORTY, R. Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations. **Annu Rev Genom Human Genet**, v. 4, p. 119-141, 2003.

BUTLER, J. M. **Advanced Topics in Forensic DNA typing: Methodology**. San Diego: Academic Press; cap. 14, p. 405-456, 2012.

CALLEGARI-JACQUES, S. M.; SALZANO, F. M. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. **Ciênc Cult**, v. 51, p. 166–174, 1999.

CALLOWAY, C. D.; REYNOLDS, R. L.; HERRIN, G. L.; ANDERSON, W. W. The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. **American Journal of Human Genetics**, v. 66, p. 1384–1397, 2000.

CARRACEDO, A.; BÄR, W.; LINCOLN, P.; MAYR, W.; MORLING, N.; OLAISEN, B.; SCHNEIDER, P.; BUDOWLE, B.; BRINKMANN, B.; GILL, P.; HOLLAND, M.; TULLY, G.; WILSON, M. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. **Forensic Sci Int**, v. 110, p. 79–85, 2000.

CHEN, X.; PROSSER, R.; SIMONETTI, S.; SADLOCK, J.; JAGIELLO, G.; SCHON, E. A. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. **American Journal of Human Genetics**, v. 57, p. 239–247, 1995.

COMAS, D.; PÄÄBO, S.; BERTRANPETIT, J. Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. **Genome Res**, v. 5, p. 89–90, 1995.

CULPI, L.; SALZANO, F. M. Migration, genetic markers and race admixture in Curitiba, Brazil. **Journal of Biosocial Sciences**, v. 16, p. 127-135, 1984.

CUMMINS, J. M.; WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Fate of microinjected spermatid mitochondria in the mouse oocyte and embryo. **Zygote**, v. 6, n. 3, p. 213-222, Aug 1998.

CURTIN, P. D. **The Atlantic slave trade: a census**. University of Wisconsin Press, Madison, 1969.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol Ecol Resour**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION - FBI. Guidelines for Mitochondrial DNA (mtDNA) Nucleotide Sequence Interpretation. **Forensic Science Communications**, v. 5, n. 2, 2003. Disponível em: < <https://archives.fbi.gov/archives/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/april2003/swgdammitodna.htm> >. Acessado: 23/09/2016.

FILOSTO, M.; MANCUSO, M.; VIVES-BAUZA, C.; VILÀ, M. R.; SHANSKE, S.; HIRANO, M.; ANDREU, A. L.; DIMAURO, S. Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. **Annals of Neurology**, v. 54, p. 524–526, 2003.

FORSTER, L.; FORSTER, P.; GURNEY, S. M.; SPENCER, M.; HUANG, C.; RÖHL, A.; BRINKMANN, B. Evaluating length heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, p. 133–142, 2010.

FRIDMAN, C.; GONZALEZ, R. S.; PEREIRA, A. C.; CARDENA, M. M. S. G. Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region in a population of southeastern Brazil. **International Journal of Legal Medicine**, v. 128, p. 589–593, 2014.

GALTIER, N.; ENARD, D.; RADONDY, Y.; BAZIN, E.; BELKHIR, K. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. **Genome Res**, v. 16, n. 2, p. 215–222, 2006.

GILES, R. E.; BLANC, H.; CANN, H. M.; WALLACE, D. C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 6715–6719, 1980.

INGMAN, M.; GYLLENSTEN, U. Rate variation between mitochondrial domains and adaptive evolution in humans. **Hum Mol Genet**, v.16, n.19, p. 2281–2287, 2007.

IRWIN, J.; SAUNIER, J.; NIEDERSTA"TTTER, H.; STROUSS, K.; STURK, K.; DIEGOLI, T.; BRANDSTA"TTTER, A.; PARSON, W.; PARSONS, T. Investigation of point heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from over 5000 global population samples. **J Mol Evol**, v. 68, p. 516–527, 2009.

IVANOV, P. L.; WADHAMS, M. J.; ROBY, R. K.; HOLLAND, M. M.; WEEDN, V. W.; PARSONS, T. J. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. **Nat Genet**, v. 12, n. 4, p. 417–420, 1996.

HAGELBERG, E.; GOLDMAN, N.; LIÓ, P.; WHELAN, S.; SCHIEFENHÖEL, W.; CLEGG, J. B; BOWDEN D. K. Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. **Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences**, v. 266, p. 485–492, 1999.

HAGELBERG, E.; GOLDMAN, N.; LIÓ, P.; WHELAN, S.; SCHIEFENHÖEL, W.; CLEGG, J. B; BOWDEN D. K. Erratum: Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. **Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences**, v. 267, p. 1595–1596, 2000.

HASEGAWA, M.; DI RIENZO, A.; KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Toward a more accurate time scale for the human mitochondrial DNA tree. **J Mol Evol**, v. 37, n. 4, p. 347–354, 1993.

HOLLAND, M. M.; CAVE, C. A.; HOLLAND, C. A.; BILLE, T. W. Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. **Croatian Medical Journal**, v. 44, p. 264-272, 2003.

HOLLAND, M. M.; FISHER, D. L.; MITCHELL, L. G.; RODRIGUEZ, W. C.; CANIK, J. J.; MERRIL, C. R.; WEEDN, V. W. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from The Vietnam War. **J Forensic Sci**, v. 38, p. 542-553, 1993.

HOLLAND, M. M.; PARSONS, T. J. Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework. **Forensic Sci Rev**, v. 11, p. 22-50, 1999.

HOWELL, N.; ELSON, J. L.; HOWELL, C.; TURNBULL, D. M. Relative rates of evolution in the coding and control regions of African mtDNAs. **Mol Biol Evol**, v. 24, n. 10, p. 2213-2221, 2007.

HUDJASHOV, G.; KIVISILD, T.; UNDERHILL, P. A.; ENDICOTT, P.; SANCHEZ, J. J.; LIN, A. A.; SHEN, P.; OEFNER, P.; RENFREW, C.; VILLEMS, R. Revealing the prehistoric settlement of Australia by Y chromosome and mtDNA analysis. **Proc Natl Acad Sci US A**, v. 104, n. 21, p. 8726-8730, 2007.

JOHNS, D. R. Paternal transmission of mitochondrial DNA is (fortunately) rare. **Annals of Neurology**, v. 54, p. 422-424, 2003.

KIVISILD, T.; METSPALU, M.; BANDELT, H. J.; RICHARDS, M.; VILLEMS, R. The world mtDNA phylogeny. In: BANDELT, H. J.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M. editors. **Human Mitochondrial DNA and the Evolution of *Homo sapiens***. Berlin: Springer-Verlag. p 149-179, 2006a.

KIVISILD, T.; SHEN, P.; WALL, D. P.; DO, B.; SUNG, R.; DAVIS, K.; PASSARINO, G.; UNDERHILL, P. A.; SCHARFE, C.; TORRONI, A. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. **Genetics**, v. 172, n. 1, p. 373-387, 2006b.

KONG, Q. P.; BANDELT, H. J.; SUN, C.; YAO, Y. G.; SALAS, A.; ACHILLI, A.; WANG, C. Y.; ZHONG, L.; ZHU, C. L.; WU, S. F. Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. **Hum Mol Genet**, v. 15, n. 13, p. 2076-2086, 2006.

LUTZ, S.; WEISSER, H. J.; HEIZMANN, J.; POLLAK, S. A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. **Hum Genet**, v. 101, p. 384, 1997.

LUTZ, S.; WEISSER, H. J.; HEIZMANN, J.; POLLAK, S. Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. **Int J Legal Med**, v. 111, n. 2, p. 67-77, 1998.

LUTZ, S.; WITTIG, H.; WEISSER, H. J.; HEIZMANN, J.; JUNGE, A.; DIMO-SIMONIN, N.; PARSON, J.; EDELMANN, J.; ANSLINGER, K.; JUNG, S.; AUGUSTIN, C. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? **Forensic Sci Int**, v. 113, p. 97-101, 2000.

MACAULAY, V.; HILL, C.; ACHILLI, A.; RENGO, C.; CLARKE, D.; MEEHAN, W.; BLACKBURN, J.; SEMINO, O.; SCOZZARI, R.; CRUCIANI, F. Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1034-1036, 2005.

MALYARCHUK, B. A.; ROGOZIN, I. B.; BERIKOV, V. B.; DERENKO, M. V. Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region. **Hum Genet**, v. 111, n. 1, p. 46-53, 2002.

MELTON, T. Mitochondrial DNA heteroplasmy. **Forensic Science Reviews**, v. 16, p. 1-20, 2004.

MELTON, T.; DIMICK, G.; HIGGINS, B.; LINDSTROM, L.; NELSON, K.. Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs. **J Forensic Sci**, v. 50, p. 73–80, 2005.

MEYER, S.; WEISS, G.; VON HAESELER, A. Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. **Genetics**, v. 152, n. 3, p. 1103-1110, 1999.

MISHMAR, D.; RUIZ-PESINI, E.; GOLIK, P.; MACAULAY, V.; CLARK, A. G.; HOSSEINI, S.; BRANDON, M.; EASLEY, K.; CHEN, E.; BROWN, M. D. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. **Proc Natl Acad Sci US A**, v. 100, n. 1, p. 171-176, 2003.

MÖRNER, M. **Race mixture in the history of Latin America**. Little, Brown, Boston, 1967.

PAKENDORF, B.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and human evolution. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 6, p. 165-183, 2005.

PALANICHAMY, M. G.; SUN, C.; AGRAWAL, S.; BANDELT, H. J.; KONG, Q. P.; KHAN, F.; WANG, C. Y.; CHAUDHURI, T. K.; PALLA, V.; ZHANG, Y. P. Phylogeny of mitochondrial DNA macrohaplogroup N in India, based on complete sequencing: implications for the peopling of South Asia. **Am J Hum Genet**, v. 75, n. 6, p. 966-978, 2004.

PALENCIA, L.; VALVERDE, L.; ALVAREZ, A.; CAINÉ, L. M.; CARDOSO, S.; ALFONSO-SÁNCHEZ, M. A.; PINHEIRO, M. F.; DE PANCORBO, M. M. Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil): predominance of the European input. **Int J Legal Med**, v. 124, n. 4, p. 331-336, 2010.

PARSON, W.; BRANDSTATTER, A.; ALONSO, A.; BRANDT, N.; BRINKMANN, B.; CARRACEDO, A.; CORACH, D.; FROMENT, O.; FURAC, I.; GRZYBOWSKI, T.; HEDBERG, K.; KEYSER-TRACQUI, C.; KUPIEC, T.; LUTZ-BONENGEL, S.; MEVAG, B.; PLOSKI, R.; SCHMITTER, H.; SCHNEIDER, P.; SYNDERCOMBE-COURT, D.; SØRENSEN, E.; THEW, H.; TULLY, G.; SCHEITHAUER, R. The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organization, results and perspectives. **Forensic Sci Int**, v. 139, p. 215–226, 2004.

PARSON, W.; BANDELT, H. J. Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. **Forensic Science International: Genetics**, v. 1, p. 13–19, 2007.

PARSON, W.; DÜR, A. EMPPOP – a forensic mtDNA database. **Forensic Science International: Genetics**, v. 1, p. 88–92, 2007.

PARSON, W.; GUSMAO, L.; HARES, D. R.; IRWIN, J. A.; MAYR, W. R.; MORLING, N.; POKORAK, E.; PRINZ, M.; SALAS, A.; SCHNEIDER, P. M.; PARSONS, T. J. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. **Forensic Science International: Genetics**, v. 13, p. 134–142, 2014.

PARSON, W.; BANDELT, H.-J. Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. **Forensic Science International: Genetics**, v. 1, p. 13–19, 2007.

PARSON, W.; PARSONS, T. J.; SCHEITHAUER, R.; HOLLAND, M. M. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. **Int J Legal Med**, v. 111, p. 124–132, 1998.

PENA, S. D. J.; CARVALHO-SILVA, D. R.; ALVES-SILVA, J.; PRADO, V. F.; SANTOS, F. R. Retrato Molecular do Brasil. **Ciência hoje**, v. 27, n. 159, p. 16 a 25, 2000.

PFEIFFER, H.; LUTZ-BONENGEL, S.; POLLAK, S.; FIMMERS, R.; BAUR, M. P.; BRINKMANN, B. Mitochondrial DNA control region diversity in hairs and body fluids of monozygotic triplets. **Int J Legal Med**, v. 118, p. 71–74, 2004.

PRIETO, L.; ALVES, C.; ZIMMERMANN, B.; TAGLIABRACCI, A.; PRIETO, V.; MONTESINO, M.; WHITTLE, M. R.; ANJOS, M. J.; CARDOSO, S.; HEINRICHS, B.; HERNANDEZ, A.; LÓPEZ-PARRA, A. M.; SALA, A.; SARAGONI, V. G.; BURGOS, G.; MARINO, M.; PAREDES, M.; MORA-TORRES, C. A.; ANGULO, R.; CHEMALE, G.; VULLO, C.; SÁNCHEZ-SIMÓN, M.; COMAS, D.; PUENTE, J.; LÓPEZ-CUBRÍA, C. M.; MODESTI, N.; ALER, M.; MERIGIOLI, S.; BETANCOR, E.; PEDROSA, S.; PLAZA, G.; MASCIOVECCHIO, M. V.; SCHNEIDER, P. M.; PARSON, W. GHEP-ISFG proficiency test 2011: paper challenge on evaluation of mitochondrial DNA results. **Forensic Sci Int Genet**, v. 7, n. 1, p. 10–15, 2013.

PRIETO, L.; ZIMMERMANN, B.; GOIOS, A.; RODRIGUEZ-MONGE, A.; PANETO, G. G.; ALVES, C.; ALONSO, A.; FRIDMAN, C.; CARDOSO, S.; LIMA, G.; ANJOS, M. J.; WHITTLE, M. R.; MONTESINO, M.; CICARELLI, R. M.; ROCHA, A. M.; ALBARRÁN, C.; DE PANCORBO, M. M.; PINHEIRO, M. F.; CARVALHO, M.; SUMITA, D. R.; PARSON, W. (2011) The GHEP-EMPOP collaboration on mtDNA population data—a new resource for forensic casework. **Forensic Sci Int**, v. 5, n. 2, p. 146–151, 2011.

PROBST, C. M.; BOMPEIXE, E. P.; PEREIRA, N. F.; DE O DALALIO, M. M.; VISENTAINER, J. E.; TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L. HLA polymorphism and evaluation of European, African and Amerindian contribution to the White and Mulatto populations from Paraná, Brazil. **Human Biol**, v. 72, n. 4, p. 597–617, 2000.

RIBEIRO, D. **O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil**. Companhia da Letras, São Paulo, 1995.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K. C.; CARVALHO, B. M.; FEIO-DOS-SANTOS, A. C.; SANTOS, S. E. B. Nucleotide variability of HV-I in Afro-descendents populations of the Brazilian Amazon Region. **Forensic Science International**, v. 167, p. 77–80, 2007.

RICHARDS, M. The mitochondrial DNA tree and forensic science. **International Congress Series**, v. 1261, p. 91–93, 2004.

ROBIN, E. D.; WONG, R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. **J Cell Phys**, v. 136, p. 507, 1988.

RÖCK, A.; Irwin, J.; DÜR, A.; Parsons, T.; Parson, W. SAM: String-based sequence search algorithm for mitochondrial DNA database queries. **Forensic Sci Int Genet**, v. 5, p. 126–132, 2011.

RÖCK, A. W.; DÜR, A.; VAN OVEN, M.; PARSON, W. Concept for estimating mitochondrial DNA haplogroups using a maximum likelihood approach (EMMA). **Forensic Sci Int Genet**, v. 7, p. 601–609, 2013.

SALAS, A.; BANDELT, H. J.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M. B. Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. **Forensic Sci Int**, v. 168, n. 1, p. 1–13, 2007.

SALAS, A.; LAREU, M. V.; CARRACEDO, A. Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report. **Int J Legal Med**, v. 114, p. 186–190, 2001.

SALZANO, F. M.; FREIRE-MAIA, N. **Populações Brasileiras, Aspectos Demográficos, Genéticos e Antropológicos**. Companhia Editora Nacional. São Paulo, 1967.

SALZANO, F. M.; FREIRE-MAIA, N. **Problems in human biology: a study of Brazilian populations**. Wayne State University Press, Detroit, 1970.

SCHWARTZ, M.; VISSING, J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. **New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 576–580, 2002.

SANCHES, N. M.; PANETO, G. G.; FIGUEIREDO, R. F.; MELLO, A. O.; CICARELLI, R. M. B. Mitochondrial DNA control region diversity in a population from Espirito Santo state, Brazil. **Mol Biol Rep**, v. 41, p. 6645-6648, 2014.

SHITARA, H.; HAYASHI, J. I.; TAKAHAMA, S.; KANEDA, H.; YONEKAWA, H. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. **Genetics**, v. 148, n. 2, p. 851-857, Feb 1998.

SHITARA, H.; KANEDA, H.; SATO, A.; INOUE, K.; OGURA, A.; YONEKAWA, H.; HAYASHI, J. I. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. **Genetics**, v. 156, n. 3, p. 1277-1284, Nov 2000.

STEIGHNER, R. J.; TULLY, L. A.; KARJALA, J. D.; COBLE, M. D.; HOLLAND, M. M. Comparative identity and homogeneity testing of the mtDNA HV1 region using denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Forensic Sciences**, v. 44, p. 1186–1198, 1999.

SUN, C.; KONG, Q. P.; PALANICHAMY, M. G.; AGRAWAL, S.; BANDELT, H. J.; YAO, Y. G.; KHAN, F.; ZHU, C. L.; CHAUDHURI, T. K.; ZHANG, Y. P. The dazzling array of basal branches in the mtDNA macrohaplogroup M from India as inferred from complete genomes. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 3, p. 683-690, 2006.

TAYLOR, R. W.; MCDONNELL, M. T.; BLAKELY, E. L.; CHINNERY, P. F.; TAYLOR, G. A.; HOWELL, N.; ZEVIANI, M.; BRIEM, E.; CARRARA, F.; TURNBULL, D. M. Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. **Annals of Neurology**, v. 54, p. 521–524, 2003.

TORRONI, A.; ACHILLI, A.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M.; BANDELT, H. J. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. **Trends Genet**, v. 22, n. 6, p. 339-345, 2006.

TORRONI, A.; SCHURR, T. G.; CABELL, M. F.; BROWN, M. D.; NEEL, J. V.; LARSEN, M.; SMITH, D. G.; VULLO, C. M.; WALLACE, D. C. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. **Am J Hum Genet**, v. 53, n. 3, p. 563-590, 1993.

TULLY, L. A.; PARSONS, T. J.; STEIGHNER, R. J.; HOLLAND, M. M.; MARINO, M. A.; PRENGER, V. L. A sensitive denaturing gradient-gel electrophoresis assay reveals a high frequency of heteroplasmy in hypervariable region 1 of the human mtDNA control region. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, p. 432–443, 2000.

TULLY, G.; BÄR, W.; BRINKMANN, B.; CARRACEDO, A.; GILL, P.; MORLING, N.; PARSON, W.; SCHNEIDER, P. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. **Forensic Science Internacional**, v. 124, p. 83–91, 2001.

TULLY, G.; BARRITT, S. M.; BENDER, K.; BRIGNON, E.; CAPELLI, C.; DIMO-SIMONIN, N.; EICHMANN, C.; ERNST, C. M.; LAMBERT, C.; LAREU, M. V.; LUDES, B.; MEVAG, B.; PARSON, W.; PFEIFFER, H.; SALAS, A.; SCHNEIDER, P. M.; STAALSTROM, E. Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding mitochondrial DNA heteroplasmy and segregation in hair shafts. **Forensic Sci Int**, v. 140, p. 1–11, 2004.

VAN OVEN, M.; KAYSER, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. **Hum Mutat**, v. 30, p. 386–394, 2009.

WALLACE, D. C.; BROWN, M. D.; LOTT, M. T. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. **Gene**, v. 238, p. 211–230, 1999.

WALLACE, D. C.; YE, J. H.; NECKELMANN, S. N.; SINGH, G.; WEBSTER, K. A.; GREENBERG, B. D. Sequence analysis of human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. **Curr Genet**, v. 12, p. 81–90, 1987.

WACHOWICZ, R. C. **História do Paraná**. Curitiba: Gráfica Vicentina, 1995.

WILSON, M. R.; DIZINNO, J. A.; POLANSKEY, D.; REPLOGLE, J.; BUDOWLE, B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. **Int J Legal Med**, v. 108, p. 68-74, 1995.

WILSON, M. R.; ALLARD, M. W.; MONSON, K.; MILLER, K. W. P.; BUDOWLE, B. Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region. **Forensic Science International**, v.129, p. 35–42, 2002a.

WILSON, M. R.; ALLARD, M. W.; MONSON, K.; MILLER, K. W. P.; BUDOWLE, B. Further discussion of the consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region. **Forensic Science Communications** (Online), 2002b. Available: <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/oct2002/wilson.htm>